SERIE A, N° 4505
N° D'ORDRE : 5352

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE Grade DE DOCTEUR Es Sciences-Physiques

PAR

DI JESO Fernando

1re THESE. — " Opheline, Phospho-Opheline, Opheline Phosphotransferase "

2e THESE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

" Application de la spectroscopie de résonance magnét-ique à l' étude des réactions euzymatiques "

Soutenues le devant la Commission d'examen.

MM. Lederer E. *Président.*
Chapeville F.
Van Thoai } *Examinateurs.*

JUIN 1965

SERIE A, N° 4505
N° D'ORDRE : 5352

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE Grade DE DOCTEUR Es Sciences-Physiques

PAR

DI JESO Fernando

1re THESE. — " Opheline, Phospho-Opheline, Opheline Phosphotransferase "

2e THESE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

" Application de la spectroscopie de résonance magnét-ique à l' étude des réactions euzymatiques "

Soutenues le devant la Commission d'examen.

MM. Lederer E. *Président.*

Chapeville F.
Van Thoai } *Examinateurs.*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

(janvier 1965)

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

- P R O F E S S E U R S -
Doyen ... M. ZAMANSKY

BRELOT	T Analyse supérieure	CHAMPETIER	T chimie macromoléculaire
PRENANT	T anatomie et histologie comparée	CUVILLIER	T micropaléontologie
		JUNG	T géologie
GRASSE	T évolution des êtres organisés	TRILLAT	T microscopie et diffraction élec
PREVOST	T chimie organique	WIEMANN	T chimie organ & structu
WYART	T Minéralo & cristallo	JACQUINOT	T spectroscopie et physique céleste (Orsay)
TEISSIER	T zoologie		
MANGENOT	T biologie végé (Orsay)	VASSY	T physique de l'atmosphère
AUGER	T physique quantique et relativité	DESTOUCHES	T théorie physique
		AMIEL	T chimie générale
MONNIER	T physiologie générale	HOCART	T minérall & cristal
PIVETEAU	T Paléontologie	J.P MATHIEU	T physique optique
ROCARD	T physique ENS	GOUTEAUX	T cytologie
CARTAN	T mathématiques ENS	MAY	T zoologie
LAFITTE	T chimie générale	CHOQUET	T théorie des fonctions et topologie
N...	T géométrie supérieure		
COULOMB	T physique du globe	FELDMANN	T biologie végétale marine
Mle GOUSIN	T biologie animale SPCN	GUINIER	T physique des solides (Orsay)
CHRETIEN	T chimie minérale		
BOCQUET	T zoologie	JOST	T physiologie comparée
KASTLER	T physique ENS	FORTET	T calcul des probabilité et physique mathématiques
EPHRUSSI	T génétique		
RIVIERE	T géologie SPCN & sédiment (Orsay)	SCHWARTZ	T Calcul dif & Intégral
		CHOUARD	T physiologie végétale
GAUTHERET	T biologie végétale PCB	MALAVARD	T aviation (technique aéron
LUCAS R.	T recherches physiques	NORMANT	T synthèse organique
THOMAS A.	T biologie cellulaire	BENARD	T chimie minérale
ARNULF	T optique appliquée	BUVAT	T botanique ENS
MORAND	T physique enseignement	DUGUE	T statistique mathématiques
SOLEILLET	T physique PCB	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
FORTIER	T Mécanique exp des fluides	ULRICH	T Physiologie végé appli
DRACH	T zoologie	MARECHAL	T Optique théo & s...li
QUENEY	T météo & dynamique atmos	KIRRMANN	T théories chimiqu...
GALLIEN	T embryologie	CHADEFAUD	T botanique
EICHORN	T botanique	Mle LE BRETON	T Physio de la nutrition
DE CUGNAC	T biologie végétale SPCN	LELONG	T appli de l'ana à la géom
Mle CAUCHOIS	T chimie physique	DEVILLERS	T anatomie & histo compa
THELLIER	T physique du globe	EHRESMANN	T topologie algébrique
L'HERITIER	T biologie générale Orsay	FRANCON	T physique SPCN
GRIVET	T radioélectricité Orsay	GLANGEAUD	T géogra phys & géol
PONCIN	T mécanique générale	DODEMENT	T mathématiques MGP
DU BREIL	T arith & théorie des nombres	PISOT	T technique math de la physi
		ROCH	T géologie
QUELET	T chimie organique	SCHATZMANN	T astrophysique
CAGNIARD	T géophysique appliquée	TERMIER	T géologie générale
		ZAMANSKY	T mathématiques générale

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544306_0010

LACOMBE T métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
BROCHARD T physique PCB (Orsay)
CABANNES T mécanique générale
LESIEUR T math I (Orsay)
MAZET T méca géné (Orsay)
CAIRE géogra physique et géo dynami
COMOLET méca des fluides
CORABOEUF T physio animale (Orsay)
DELLOUE T physique de l'exosphère
GORENFLOT botanique II (Orsay)
HOUILLON biologie animale PCB
JULLIEN J. CHIMIE SPCN (Orsay)
MAIGRANGE T technique mathé de la phys Ors
OLIVIER Antropologie
NOZERAN T botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE T physique ENS (Orsay)
CHEVAUGEON T botanique (Orsay)
KAHANE T mathématiques (Orsay)
SAMUEL T math ENS féminines
KOURGANOFF T astronomie (Orsay)
THIRY T méca céleste
ABELES physique SPCN
AMAT T physique PCB
AUBOIN T géologie
Mme BENOIT-GUEUTAL T physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
BOUGIS Biologie marine Villefranche/mer
BRUHAT T math MPC
BRUNN T géologie historique Orsay
CHABBAL T physique MGP (Orsay)
DEHEUVELS T math propé
D'ESPAGNAT T physique théorique (Orsay)
FURON T géologie SPCN
Mme GANS T génétique
GENEVES biologie végétale PCB
GUILBERT physique CUS Orléans
HUPE T pétrographie
HOLLANDE T biolo géné
LIONS T analyse numérique
MAITTE T chimie PCB
MEYER physique propé
NICOLAS géologie appliquée
PANIGEL biologie générale
RAVIER Pétrographie
ROSEAU T méca théorique des fluides
ROUBINE électronique
SILBER T chimie PCB
UEBERSFELD T électronique
YVON T théories physiques
HERVE T mathématiques

NERON T Math MPC (Orsay)
Mme PECKER WIMEL T astrophysique
BALKANSKY physique MPC
LE CORRE T électricité
DELCROIX T physique théorique (Orsay)
GOURDIN physique théorique (Orsay) des hautes énergies
LEHMANN T phys exp des hautes énergies
NATAF T physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
ECHALIER biologie animale PCB
BARRAUD physiolo cellulaire
LIORET Physiologie végé Orsay
DARS géologie structurale & géolo appli
CAMEFORT T botanique (agrégation
VICHNIEWSKY T mécanique industrielle
BLAQUIERE électronique (Orsay)
ARNOUS T physique théorique
TATIBOUET chimie (CSU Orléans)
MALLIAVIN T math propé (Orsay)
GAUDEMAR chimie propé
PEREZ Y JORBA physique Exp des Hautes énergies (Orsay)
DAVID T chimie (agrégation Orsay)
BROUSSE T mécanique théorique
ROSCH T astronomie
GUY T physique expérimentale
LAZARD math MPC
MOREL Pierre physique MPC
ARSAC programmation
LEFEBVRE chimie MPC
CHAPEVILLE biochimie
BENOIT physique CPEM
RIO chimie CPEM
JAUZEIN géologie ENS
PREVOST Geor BV CPEM
FAVARD P. BA CPEM
VILKAS chimie CPEM
Mle FICINI chimie CPEM
LEQUEUX astronomie
COHEN TANNOUDJI physique MPC
TAVERNIER physique CPEM
Mme ROIZEN " "
DURAND M. BA SPCN
PASCAUD physiologie
Mme PETIT BA CPEM
BROUSSE géologie orsay
CAGNIAC physique agrégation Orsay
LEBERRE zoologie (Orsay)
SCHEFFER Microbiologie (Orsay)
de GENNES physique des solides (Orsay)
RIOU physique nuclé exp Orsay
CLAUSER chimie biolo Orsay
CHEVALIER physio animale Orsay

JANCOVICI	physique atomique Orsay
FALK-VAIRANT	physique nucléaire Orsay
FETIZON	chimie propé Orsay
CERF	mathématiques Orsay

LE SECRETAIRE GENERAL

R. POULLAIN

" OPHÉLINE, PHOSPHO-OPHÉLINE, OPHÉLINE PHOSPHOTRANSFÉRASE "

INTRODUCTION

Les phosphagènes constituent un chapitre de biochimie comparée qui a beaucoup évolué ces dernières années. Il s'est ouvert, il y a trente cinq ans par les recherches de Fiske et Subbarow (1927, 1929), d'Eggleton et Eggleton (1927, 1928, 1929) et de Meyerhof et Lohmann (1928a, 1928b) qui conduisirent à la découverte de la phosphocréatine (Fiske et Subbarow, 1929) et de la phosphoarginine (Meyerhof et Lohmann, 1928). La synthèse de la première de ces deux substances a été réalisée beaucoup plus tard, par Zeile et Fawaz (1938), Ennor et Stocken (1948), Pradel, Thiem, Pin et Thoai (1959); celle de la seconde ne l'a été réalisée qu'en 1962 par Thiem, Thoai et Roche, et par Cramer, Schieffele et Vollmar (1962), selon deux méthodes différentes.

La phosphoglycocyamine et la phosphotaurocyamine ont été découvertes, il y a dix ans, par Thoai et collaborateurs (1953, 1954a), isolées et synthétisées par Thoai et Thiem en 1957. La phospholombricine a été découverte en 1953 par Thoai et Robin (1954b) et synthétisée en 1960 par Beatty, Ennor et Magrath. La phosphohypotaurocyamine a été identifiée par Robin et Thoai en 1962; elle n'a pas encore été synthétisée, mais

elle a été obtenue à un haut degré de pureté par transphosphorylation enzymatique en 1962 par Thoai, Robin et Pradel.

Après les premières études poursuivies sur la répartition de la phosphocréatine, de la phosphoarginine et des deux bases guanidiques libres dans le règne animal, il a été généralement admis que la répartition de ces dérivés guanidiques suit un ordre phylogénétique (Needham, Needham, Baldwin et Yudkin, 1932). En effet, on avait retrouvé la créatine (Hunter, 1928) et la phosphocréatine (Eggleton et Eggleton, 1928) chez les Vertébrés et non chez les Invertébrés, dont les muscles ne paraissaient renfermer que de l'arginine et de la phosphoarginine (Baldwin et Needham, 1934; Eggleton et Eggleton, 1928; Meyerhof, 1928, Needham, Needham, Baldwin et Yudkin, 1932; Schütze, 1932). Plus tard, on a mis en évidence la phosphocréatine, mais non la phosphoarginine, chez des Protochordés; de plus, ces deux phosphagènes coexistent chez des Echinoïdés. Ces données semblaient confirmer les théories de l'évolution, selon lesquelles une transition biochimique entre Vertébrés et Invertébrés était observée au même niveau de la classification que celui auquel se manifeste une transition morphologique entre ces deux groupes zoologiques (Baldwin et Yudkin, 1950).

Depuis dix ans un nombre important de recherches, poursuivies surtout sur les Annélides, mais aussi sur d'autres groupes zoologiques comme les Porifères, ont révélé des cas de plus en plus nombreux d'animaux appartenant à la même classe

zoologique, quelquefois à la même famille, et possédant des phosphagènes différents. La contribution la plus importante à ces recherches a été apportée par Thoai et ses collaborateurs (Thoai, Roche, Robin et Thiem, 1953; Thoai et Robin, 1954b; Roche et Robin, 1954; Thoai et Roche, 1957; Roche, Robin, Thoai et Pradel, 1960; Robin et Thoai, 1962); ils ont montré "qu'aucun phosphagène ne caractérise une classe ou une famille définie d'animaux" (Thoai et Roche, 1957).

Un autre point élucidé au cours de ces dix dernières années (Thoai et Roche, 1964) est le rapport entre les phosphagènes et les guanidines libres dans les tissus d'un même animal. La base guanidique correspondant au phosphagène est, bien entendu, toujours présente, mais d'autres composés guanidiques qui ne participent pas à la formation du phosphagène peuvent exister en grandes quantités chez un même animal. Tel est le cas de l'octopine chez les Céphalopodes (Thoai, Roche et Robin, 1953; Thoai et Robin, 1959), de l'arcaïne chez Arca noae (Roche, Robin, Thoai et Pradel, 1960), de la taurocyamine chez des Porifères (Roche et Robin, 1954; Robin et Roche, 1954). D'autre part, il est presque de règle que, si un seul dérivé guanidique est présent dans le muscle on le retrouve comme constituant du phosphagène musculaire. Un autre cas intéressant est celui de la créatine et de la phosphocréatine chez des animaux comme Arenicola marina L., Leptosynapta inhaerens Müller, Martasterias glacialis L. (Roche, Thoai et Robin, 1957),

Diadema setosum (Yanagisawa, 1959), où ces corps sont présents seulement dans les spermatozoïdes et non dans les autres cellules ou tissus de l'organisme.

L'étude d'un phosphagène ne devrait jamais être séparée de celle des dérivés guanidiques présents dans les animaux d'où le phosphagène a été isolé; elle devrait toujours être complétée par celle de la phosphotransférase correspondante. Les deux premiers enzymes de ce groupe, la créatine kinase (EC.2.7.3.2) et l'arginine kinase (EC.2.7.3.3) ont été mises en évidence il y a trente ans par Lohmann (1934, 1935). En 1957, Thoai a décrit la taurocyamine kinase et la glycocyamine kinase (EC.2.7.3.1); en 1960, Rosenberg et collaborateurs la lombricine kinase, et en 1962 Thoai, Robin et Pradel l'hypotaurocyamine kinase (1963).

Aussi est-ce en tenant compte de cet ensemble de points de vue que nous avons entrepris l'étude du phosphagène et de l'ATP : guanidine phosphotransférase d'Ophelia neglecta quand, il y a deux ans, nous avons remarqué la présence d'un dérivé guanidique nouveau dans cette espèce. Pour la même raison, nous avons étendu nos recherches à un autre représentant de la famille des Ophelidae.

OBJET DU TRAVAIL (1)

Les recherches qui font l'objet du présent travail ont porté d'abord sur l'analyse chromatographique des guanidines monosubstituées de deux espèces de Polychètes sédentaires appartenant au genre Ophelia, O. neglecta Schneider et O. bicornis Savigny.

Les dérivés guanidiques musculaires, qui entrent dans la constitution des phosphagènes, ont été ensuite isolés, cristallisés et analysés. Nous avons montré que les bases guanidiques musculaires, et donc les phosphagènes correspondants de deux espèces animales voisines, sont différents. Chez O. bicornis elle est constituée par la lombricine, qui n'a été rencontrée jusqu'à présent que chez les Oligochètes. Chez O. neglecta, la base guanidique est un nouveau dérivé monosubstitué, qui a été identifié et dont la structure a été confirmée par synthèse. Ce corps a été appelé ophéline.

Le phosphagène correspondant, la phospho-ophéline, a été également isolé et identifié. Le produit de phosphorylation chimique de l'ophéline que nous avons préparé peut servir de donateur de phosphate en présence d'ADP et d'une phosphotransférase extraite de l'O. neglecta.

---

(1) Travaux réalisés grâce à une bourse de l'OTAN attribuée à la suite du concours annuel en 1961, et à la subvention du C.N.R. Italien, n° 08/7600/7412 du 24 juillet 1962.

Le nouvel enzyme, appelé ATP : ophéline phosphotransférase, qui catalyse la réaction réversible

$$\text{ATP} + \text{ophéline} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{phospho-ophéline} + \text{ADP}$$

a été préparé et ses propriétés examinées.

L'ensemble des faits rapportés dans le présent travail contribue en premier lieu à la connaissance de nouveaux types de bases guanidiques et de phosphagènes. En mettant en évidence le degré de spécificité de la nouvelle ATP : guanido phosphotransférase et l'analogie de certaines de ses propriétés avec celles des enzymes du même type, cette étude permet également des rapprochements utiles du point de vue de la biochimie comparée.

CHAPITRE I

LES DÉRIVÉS GUANIDIQUES DANS OPHELIA NEGLECTA ET O. BICORNIS

La répartition des guanidines monosubstituées présentes dans O. neglecta et O. bicornis a été étudiée d'abord par analyse chromatographique sur papier des extraits tissulaires de ces polychètes. La caractérisation des produits connus a été complétée ensuite par purification, cristallisation et analyse des bases guanidiques isolées. C'est ainsi que la lombricine a été caractérisée pour la première fois chez un polychète sédentaire, O. bicornis.

Enfin, le dosage spécifique des guanidines monosubstituées après passage sur colonne de résine permet une étude quantitative de leur répartition dans les différents compartiments tissulaires des polychètes.

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS TISSULAIRES.

Les deux espèces du genre Ophelia, respectivement O. neglecta Schneider et O. bicornis Savigny, ne diffèrent morphologiquement que par le nombre de leurs branchies, 18 paires dans la première, 16 dans la seconde, dont la taille

est légèrement plus petite. Elles présentent plutôt des différences écologiques. O. neglecta a été pêchée dans le sable découvert à basse-mer de vive eau à Terrenez, sur la côte nord de la Bretagne, et O. bicornis sur la même côte à l'embouchure du Guillec.(*)

Les animaux bien essorés sont disséqués et les muscles sont séparés des tractus digestifs et génitaux. Les muscles et les tractus sont broyés séparément et extraits par l'acide acétique à 2 % à raison de 3 ml par gr de tissu ; les deux extraits sont ensuite chauffés 5 min. à 100°C, centrifugés et les liquides surnageants sont chromatographiés dans plusieurs solvants, à 21°C, sur papier Whatman n° 1. Les dérivés guanidiques ont été révélés par les réactions à l'α-naphtol-hypobromite alcalin, spécifique des guanidines monosubstituées, et au diacétyle-α-naphtol, caractéristique des guanidines mono- et disubstituées dissymétriques (Roche, Thoai et Hatt, 1954). Dans les extraits tissulaires des deux espèces, nous avons identifié 4 guanidines monosubstituées différentes : les Rf de trois d'entre elles correspondaient respectivement à ceux de l'arginine, de la taurocyamine et de la lombricine, tandis que les Rf de la quatrième ne correspondaient à aucun dérivé guanidique connu. Nous avons appelé

(*) Nous remercions tres vivement M. L. Amoureux, attaché de recherches au C.N.R.S., d'avoir bien voulu assurer la délicate identification des animaux utilisés dans nos expériences.

ophéline ce dernier composé. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I

Répartition des bases guanidiques dans divers tissus de deux espèces d'Ophelia. A = arginine, L = lomoricine, O = ophéline, T = taurocyamine.

Espèces	Guanidines trouvées dans les extraits acétiques de muscle et de tractus.	
	Muscle	Tractus
Ophelia bicornis	L	L
Ophelia neglecta	O + traces d'A	A + faibles quantités d'O et T

L'examen des résultats traduit la présence d'un seul dérivé guanidique dans les différents tissus d'O. bicornis, en particulier dans le muscle. Ce corps doit donc aussi être la base du phosphagene de ce ver. Ses valeurs de Rf correspondent à celles de la lombricine; son identité avec cette dernière a pu être démontrée après isolement et purification. Il n'est

pas présent dans O. neglecta, qui renferme une autre guanidine musculaire, que nous avons appelée ophéline et dont nous avons déterminé la structure; elle participe à la constitution du phosphagène et est présente dans tous les tissus de ce ver. Dans le tractus de cette espèce il existe aussi de l'arginine et de la taurocyamine.

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE LA LOMBRICINE

160 gr d'O. bicornis sont broyés dans 320 ml d'éthanol à 50 % contenant H_2SO_4 0,02 N, les homogénats sont portés à 100°C pendant 2 min. et centrifugés. Le résidu est extrait à nouveau à chaud par 160 ml de la même solution. Les deux liquides surnageants réunis sont neutralisés par la baryte en solution saturée et centrifugés. Le précipité barytique est lavé et l'eau de lavage est réunie à l'extrait.

L'extrait est passé sur une colonne de 250 cm^3 (66 x 2,2 cm) de Dowex 50 X 8 (H^+) 50-100 "mesh"; on lave la colonne avec 700 ml d'eau. L'effluent est analysé au fur et à mesure qu'il sort, à l'aide des réactions colorées des guanidines monosubstituées et de la ninhydrine, pour contrôler qu'il ne contient pas de lombricine. L'effluent renferme seulement de petites quantités de corps réagissant avec la ninhydrine et des traces de guanidoéthylphosphate, provenant sans doute de la décomposition de la lombricine au cours des manipulations. La lombricine est éluée par 500 ml d'ammoniaque 2 N; elle sort presque entièrement dans les premiers 350 ml d'un liquide jaune très limpide, non alcalin, renfermant aussi des corps sensibles à la ninhydrine (Rf 0,07; 0,13; 0,20 en pyridine-isoamylol-ac. acétique-eau = 8:4:1:4 = sur Whatman n. 1 à 21°C). Ces mêmes corps sont plus concentrés

dans le reste de l'éluat qui est alcalin, trouble et renferme très peu de lombricine.

On concentre jusqu'à 60 ml les premiers 350 ml d'éluat riche en lombricine. 40 de ces 60 ml sont perdus en différents essais; les 20 ml restants sont amenés à pH 5, décolorés au charbon "Norit A Charcoal" de la Delta Chemicals à 60°C pendant 5 min. et filtrés. Le filtrat est séché sur P_2O_5, repris par l'eau et amené à pH 2,5 par l'acide formique (volume final 2,5 ml), puis passé sur une colonne de 400 cm^3 (105 x 2,2 cm) de Dowex 50 X 4 200-400"mesh" tamponnée à pH 2,5. La résine est préparée de la façon suivante : a) dans un récipient de 6 litres un kilo de résine est laissé en contact avec 3 litres de soude 2 N à 60°C pendant 5 h; on agite de temps en temps; b) après refroidissement la résine est lavée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à neutralité; après chaque addition d'eau la masse est agitée quelques minutes, puis laissée au repos pendant 10 minutes; aussitôt apres, le liquide surnageant, contenant en suspension des grains de taille différente de la moyenne, est siphonné; c) la résine est abandonnée une nuit dans 3 litres de soude 2N; d) elle est lavée une dizaine de fois à l'eau par siphonnage comme ci-dessus; e) elle est passée sur filtre en verre fritté et lavée à l'eau jusqu'à neutralité; f) la résine est traitée rapidement par 3 litres d'HCl 2 N; g) lavée sur verre fritté jusqu'à neutralité et sécnée. 400 ml de la résine

sont mis en suspension sous agitation, dans 1 litre de pyridine 5 M et abandonnés pendant une nuit. La résine est ensuite essorée sur verre fritté et lavée avec 1200 ml d'eau, 800 ml de tampon à pH 2,5. Elle est remise en suspension dans 600 ml du même tampon et agitée de temps en temps pendant 2 h, pour éliminer toutes les bulles d'air. La suspension est alors introduite dans la colonne, en 15 petites portions, toutes de même volume; une pression est exercée sur la surface supérieure de la colonne pendant quelques instants après chaque addition. Après l'addition de la dernière fraction, un disque de papier Whatman est déposé à la surface de la résine.

Les tampons employés sont tous des tampons volatils à la pyridine. Le tampon de pH 2,5 renferme de la pyridine 0,04 M et de l'acide formique environ 0,4 M; il est employé pour tamponner la résine et alimenter la colonne après l'addition de l'échantillon. Après 800 ml de ce premier tampon, on ajoute sur la colonne 500 ml d'un deuxième tampon de pH 3,1 constitué par de la pyridine 0,1 M et de l'acide formique environ 0,3 M et 400 ml d'un troisième tampon de pH 3,1 contenant de la pyridine 0,2 M et de l'acide formique environ 0,6 M. La vitesse d'écoulement, tres constante, est de 81 ml/h. L'effluent est récolté par fractions de 25 ml, qui sont systématiquement analysées par chromatographie sur papier, au moyen des réactions colorées des guanidines monosubstituées et de la réaction à la ninhydrine. Le diagramme d'élution est reporté sur la figure 1.

Figure 1

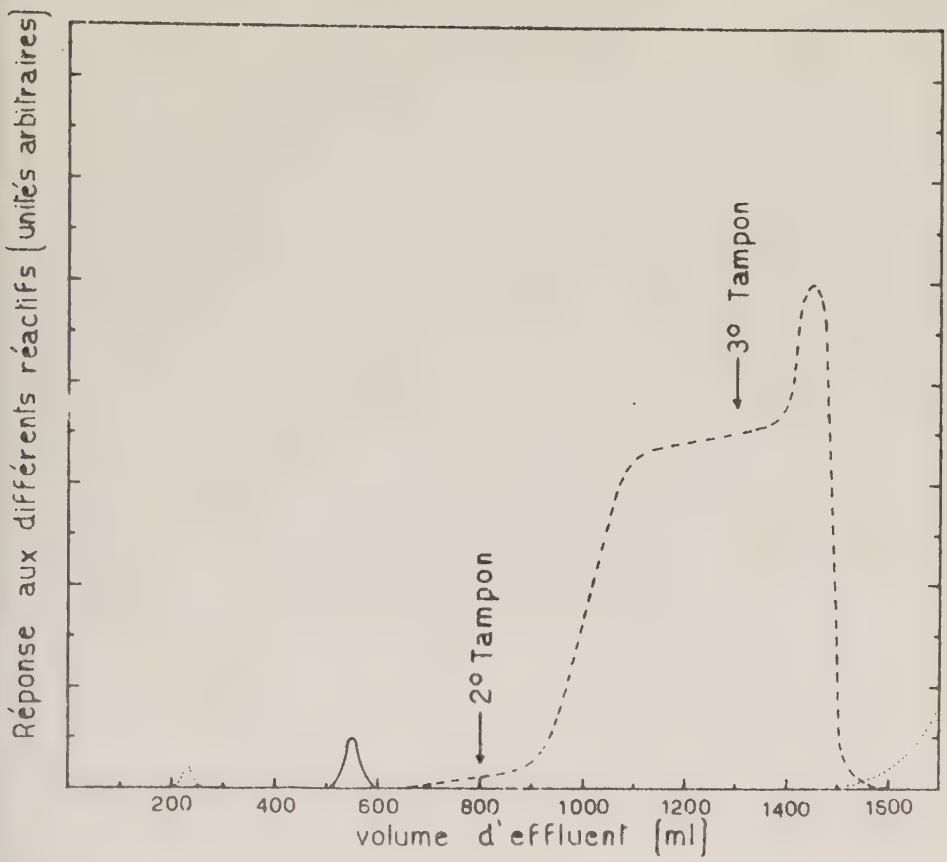


Fig. 1 - Diagramme d'élution de la lombricine et autres corps libres d'O. bicornis sur 400 cm^3 de Dowex 50 X 4 tamponné, 200-400 "mesh". Tampons volatils à la pyridine décrits dans le texte.
Abscisses: volume d'effluent en ml.
Ordonnées: intensité des réactions colorées (unités arbitraires)
Courbe en trait plein: réaction de Sakaguchi (guanido-éthyl-phosphate)
Courbe en trait pointillé: réaction à la ninhydrine.
Courbe en petits tirets: pic de la lombricine positif aux réactions de Sakaguchi et à la ninhydrine.

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'OPHÉLINE.

100 gr d'*O. neglecta* sont broyés dans 200 ml d'eau. L'homogénat est acidifié par l'acide sulfurique jusqu'à pH 3-4, porté à 100°C pendant 5 min. et centrifugé. Le résidu est réextrait deux fois, chaque fois dans 100 ml d'eau à pH 3-4 et à 100°C pendant 1 min. Les trois extraits réunis sont neutralisés par la baryte en solution saturée et ils sont centrifugés; le précipité barytique est lavé deux fois à l'eau et les eaux de lavage sont réunies aux extraits. L'ensemble est filtré, puis concentré sous vide jusqu'à environ 80 ml, passé ensuite sur une colonne de 300 cm^3 (80 x 2,2 cm) de résine Dowex 50 X 2 (H^+) 100-200 "mesh". Après le passage de l'échantillon, la colonne est lavée avec 1.700 ml d'eau et éluée avec 900 ml d'ammoniaque 2 N.

La vitesse d'écoulement, très constante, est de 98 ml/h. L'effluent est récolté par fractions de 50 ml et la sortie des dérivés guanidiques est suivie sur celles-ci à l'aide des réactions colorées indiquées plus haut et de la chromatographie sur papier.

La figure 2 indique les pics de sortie des trois dérivés guanidiques et ceux des corps qui réagissent positivement, soit à la ninhydrine, soit au p-diméthylaminobenzaldéhyde (Dagliesh, 1952).

Fig. 2

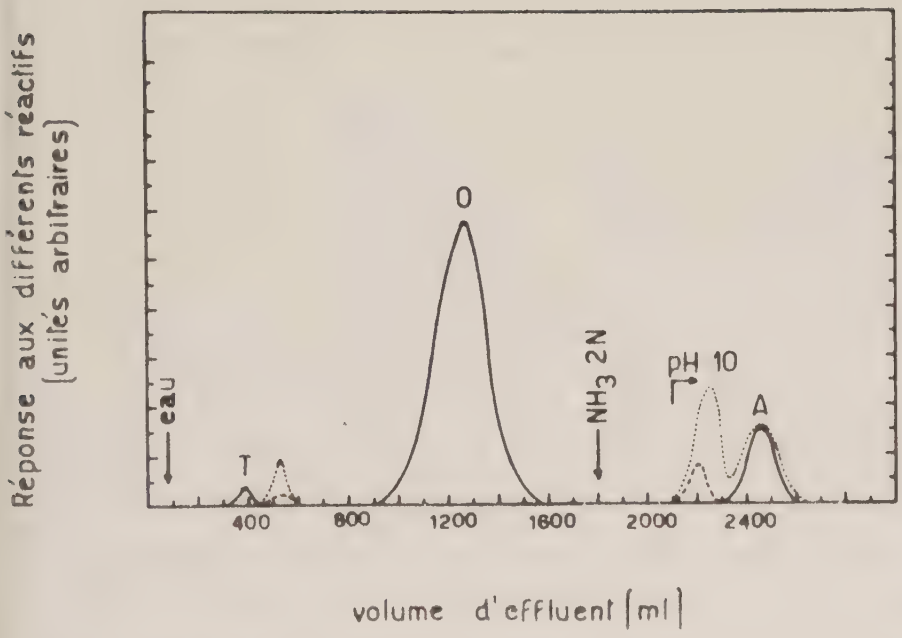


Fig. 2 - Diagramme d'élution des dérivés guanidiques et autres corps libres d'O. neglecta sur 300 cm^3 de Dowex 50$^-$X 2 (H^+) 100-200 "mesh".

Abscisses: volume d'effluent en ml.

Ordonnées: intensité des réactions colorées (unités arbitraires)

Courbe en trait plein: réaction des guanidines monosubstituées

Courbe en trait pointillé: réaction à la ninhydrine

Courbe en petits tirets: réaction à la p-dimethylaminobenzaldéhyde.

Les fractions contenant l'ophéline, c'est-à-dire celles qui sont émises après un volume d'effluent correspondant à 3 fois celui de la colonne et avant la sortie du 7ème volume d'effluent, sont concentrées sous vide jusqu'à 8 ml environ, puis repassées sur une seconde colonne (20 x 1 cm) de 16 cm^3 de la même résine. Mais, cette fois, la résine est préparée de façon particulière; laissée quelques heures à chaud dans 3 volumes de NaOH 2 N, elle est mise dans la colonne, lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité, puis traitée à nouveau, toujours sur la colonne, avec 3 volumes de NaOH 2 N. Elle est ensuite lavée jusqu'à neutralité avec de l'eau permutée, redistillée et bouillie, puis traitée avec 3 vol. d'HCl 2 N préparé avec la même eau redistillée. La résine est alors lavée jusqu'à neutralité avec de l'eau permutée, redistillée et bouillie. Cette même eau est employée pour laver la colonne après le passage du produit. L'effluent est recueilli par fractions de 5 ml, qui sont analysées à l'aide des réactions colorées des guanidines monosubstituées. Les 4e, 5e et 6e volumes d'effluent contiennent l'ophéline. Ils sont concentrés et séchés sous vide. Le résidu est repris dans le minimum d'eau permutée, redistillée, bouillie, et la solution fractionnée entre 40 et 95 % d'éthanol à 0°C et en présence de 3 % d'acide acétique. On obtient 170 mg de cristaux en forme de prismes hexagonaux qu'on fait recristalliser

encore deux fois dans l'alcool à 80 % en présence de 3 % d'acide acétique. Les cristaux lavés à l'alcool-éther et à l'éther, séchés, fondent à 271°C (fig. 3). Après addition d'acétone, jusqu'à la concentration de 65 %, il se forme dans les eaux-mères un précipité d'ophéline chromatographiquement pure, de point de fusion de 306°C.

Fig. 3

(Grossissement X 75)

(Grossissement X 300)

Fig. 3 - Cristaux d'ophéline.

DOSAGES DES DÉRIVÉS GUANIDIQUES DANS LES DIVERS TISSUS D'OPHELIA NEGLECTA.

On dissèque les vers après les avoir soigneusement essuyés sur papier filtre et l'on égoutte le liquide coelomique du muscle et du tractus. On obtient 4,1 gr de muscle, 2,6 gr de tractus et 3,2 gr de liquide. On broie le muscle et le tractus dans l'acide acétique à 2 % à raison de 2 ml par gr de tissu et l'on amène à 100°C pendant 10 min, opération qui hydrolyse les phosphagènes et libère les bases guanidiques qu'ils renferment; après centrifugation on réextrait les résidus 3 fois avec l'acide acétique à 1 %, à raison de 2 ml par gr de tissu la première fois et de 1 ml les deux fois suivantes. On ajoute au liquide coelomique de l'acide acétique jusqu'à concentration finale de 2 % et l'on amène à 100°C pendant 10 min.; après centrifugation, on réextrait le résidu 3 fois avec de l'acide acétique à 1 %, à raison de 1 ml par gr de liquide la première fois et de 0,5 ml les deux fois suivantes.

Les surnageants des extractions successives une fois réunis, on mesure exactement les volumes des trois extraits, puis on les passe, par prises d'essai de 2 ml, sur des petites colonnes de 2 cm^3 de résine Dowex 50 X 2 (H^+) 100-200 "mesh". On lave ensuite les colonnes avec 16 ml d'eau; on recueille, par fraction de 1 ml, l'effluent contenant, dans l'ordre, la

taurocyamine et l'ophéline, et l'on élue l'arginine par 8 ml d'ammoniaque 2 N. Des essais préliminaires permettent d'établir exactement, à l'aide de la réaction au diacétyle-α-naphtol (Rosenberg, Ennor et Morrison, 1956) et de la chromatographie sur papier (Roche, Thoai et Hatt, 1954), quelles fractions renferment les différents corps. Dans les essais suivants, on collecte soigneusement et quantitativement les fractions correspondantes à chaque pic et l'on dose au diacétyle-α-naphtol leur constituant guanidique. On opère toujours un dosage sur les fractions qui précèdent et qui suivent immédiatement chaque pic pour s'assurer qu'elles sont dépourvues du produit caractérisé par celui-ci. Avant de doser l'arginine, on débarrasse l'éluat de l'ammoniaque en l'évaporant à sec et en reprenant le résidu par l'eau, pour éviter qu'il n'inhibe les réactions sur lesquelles est basé son dosage.

Nous avons choisi différentes concentrations des guanidines à doser, entre les limites de sensibilité de la réaction, et opéré plusieurs dosages pour chaque concentration en nous référant à une courbe étalon déterminée sur des solutions titrées des produits purs. Dans le cas particulier de l'ophéline, le corps de référence utilisé est le produit pur dont la synthèse sera décrite au chapitre II.

Les résultats exprimés en mg et en µmoles de guanidines par gr de tissu frais sont rassemblés dans le tableau II; ils correspondent à la somme des guanidines libres et

phosphorylées présentes dans les tissus. L'ophéline et l'arginine sont présentes dans tous ceux-ci, mais le premier corps représente essentiellement le dérivé musculaire prédominant, tandis que l'arginine est surtout présente dans le tractus. Des faibles quantités de taurocyamine ont été retrouvées seulement dans le tractus. La teneur en ophéline dans l'animal entier est presque 10 fois celle en arginine et 100 fois celle en taurocyamine.

Tableau II

TABLEAU II

Répartition des différents dérivés guanidiques dans les divers tissus de l'Ophelia neglecta Schneider (mgr. et µmoles de guanidines par gramme de tissus frais).

Guanidines dosées	Muscle		Tractus		Liquide coel.	
	mg	µmoles	mg	µmoles	mg	µmoles
Taurocyamine	0	0	0,055	0,33	0	0
Ophéline	4,5	23	0,064	0,32	0,043	0,22
Arginine	0,072	0,41	0,37	2,1	0,039	0,22

DISCUSSION

Les résultats rassemblés dans le tableau I montrent pour la première fois que les tissus d'espèces animales diverses appartenant à un même genre peuvent renfermer des bases guanidiques différentes. En outre, les deux espèces d'Ophelia qui se distinguent seulement par quelques détails morphologiques, n'ont en commun aucune guanidine, en dehors de l'arginine. Dans les conditions d'extraction de nos expériences, les phosphagènes sont hydrolysés et l'on détermine l'ensemble des guanidines, libres ou provenant des phosphagènes. Aussi peut-on supposer que le phosphagène d'O. bicornis est constitué par la phospholombricine, puisque la lombricine est la seule guanidine présente dans l'espèce. De même l'ophéline étant la seule guanidine musculaire de d'Ophelia neglecta à côté de traces d'arginine, le phosphagène de cette espèce est apparu comme devant être la phosphophéline, ce qui a été démontré au cours de ce travail.

La méthode employée pour la purification de la lombricine consiste essentiellement à l'éluer du Dowex 50 à l'aide de solvants volatils de différents pH. Elle diffère donc des autres techniques employées jusqu'ici (Robin, 1954; Thoai et Robin, 1954b; Pant, 1959; Rosenberg et Ennor, 1959; Ennor,

Rosenberg, Rossiter, Beatty, Gaffney, 1960) et nous semble beaucoup plus simple. Malheureusement nous ne pouvons pas comparer le rendement que nous avons obtenu et celui indiqué par les autres auteurs, car nous avons opéré sur des animaux différents. De toute façon et quelle que soit la concentration de la lombricine dans les animaux étudiés, le rendement, compris entre 1,4 et 2,5 mg par gr de tissus, est supérieur à tous ceux obtenus antérieurement. Des tampons analogues à ceux de notre méthode ont été employés en 1961 par Tomášek, Holejšovsky, Mikes et Šorm et par Liebster, Kopoldová et Dobiášová pour la séparation chromatographique d'aminoacides, mais nous avons équilibré notre colonne à pH 2,5 au lieu de 3,1, le premier de nos trois tampons étant différent de tous ceux employés auparavant, non seulement par son pH, mais encore par sa faible teneur en pyridine.

La méthode de purification de l'ophéline est aussi très simple, car ce corps ne se fixe pas sur la résine Dowex 50 (H^+) et la filtration à travers l'échangeur d'ions n'a lieu qu'avec un certain retard. L'élimination de la majeure partie des impuretés se fait aisément, soit qu'elles restent fixées sur la colonne, soit qu'elles sortent avant l'ophéline, sans perte sensible de celle-ci. L'examen de la fig. 2 montre comment la même résine permet une bonne séparation des 3 dérivés guanidiques présents dans les tissus d'O. neglecta : tauro-

cyamine, ophéline et arginine qui,une fois séparés, sont aisément dosables par un réactif du groupement guanidique.

Les résultats des dosages montrent comment dans O. neglecta presque toute l'ophéline est présente,en quantité très élevée, dans le muscle où elle constitue pratiquement le seul dérivé guanidique présent. Ce résultat concorde bien avec le fait que le seul phosphagène musculaire d'O. neglecta est la phosphophéline, comme nous le verrons plus tard. Dans le liquide coelomique la concentration en dérivés guanidiques, ophéline et arginine, est très faible. L'arginine domine dans le tractus, dans lequel il est remarquable que l'on trouve de faibles quantités de taurocyamine que nous n'avons pas réussi à déceler dans les autres tissus et dont il est difficile d'établir quelles sont ses relations métaboliques avec l'ophéline en l'état actuel de nos recherches sur ce ver.

CHAPITRE II

OPHÉLINE ET PHOSPHO-OPHÉLINE

Le nouveau dérivé guanidique musculaire trouvé chez O. neglecta, appelé ophéline, une fois isolé et purifié, a été identifié et sa structure déterminée par analyse et par synthèse. Le phosphagène correspondant, la phospho-ophéline, a été également isolé et caractérisé.

IDENTIFICATION ET DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE DE L'OPHÉLINE

L'ophéline est très soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 50 %, jusqu'à la concentration de 15 % à 25°C, dix fois moins soluble dans l'éthanol à 80 %, pratiquement insoluble dans l'éthanol absolu, insoluble dans le benzène. Elle réagit positivement sur papier au réactif à l' α-naphtol-hypobromite alcalin et au réactif au molybdate-SH_2 pour les esters phosphoriques (Hanes et Isherwood, 1949); elle est très résistante même à 100°C pendant quelques heures à l'action de H_2O_2 à 2 volumes et de l'acétate mercurique à 5 %.

Les valeurs de Rf obtenues par chromatographie sur papier dans différents solvants sont rassemblées dans le tableau III.

TABLEAU III

Valeurs des Rf de l'ophéline dans différents solvants, sur papier Whatman n° 1, à 21°C.

Solvants	sens de la migration	Rf
Isoamylol saturé d'acide formique 4 N	ascendant	0,00
n-butanol-acide acétique-eau (73:10:17)	"	0,17
" "	descendant	0,20
" (40:10:10)	ascendant	0,23
éthanol-eau (77:23)	"	0,52
méthanol-acide acétique-eau (80:10:20)	descendant	0,68
phénol-saturé d'eau	"	0,87
n-propanol-acide acétique-eau (40:10:10)	ascendant	0,33
n-propanol-ammoniaque à 20%-eau (73:20:7)	"	0,53
n-propanol-eau (80:20)	"	0,22
pyridine-isoamylol-acide acétique-eau (80:40:10:40)	"	0,25
pyridine-isoamylol-ammoniaque à 20%-eau (80:40:10:40)	"	0,37
pyridine-isoamylol-eau (80:40:70)	"	0,48
pyridine-éthanol-ammoniaque à 20%-eau (30:30:30:10)	descendant	0,66

L'analyse élémentaire donne la composition suivante:

C = 24,6 %

H = 6,3 %

N = 21,1 %

P = 16,2 %

La formule brute correspondante est donc :

$C_4H_{12}O_4N_3P$.

Par hydrolyse de l'ophéline dans HCl 3N à 100°C pendant 2 h en tube scellé, il se forme de l'acide guanidoéthylphosphorique. Si les mêmes conditions d'hydrolyse sont maintenues pendant 12 h, le guanidoéthanol apparaît à côté de ce corps. Nous avons identifié ces deux produits d'hydrolyse de l'ophéline à l'aide de la chromatographie sur papier par référence avec le guanidoéthanol et le guanidoéthylphosphate purs, obtenus par amidination, le premier de l'éthanolamine, le second de l'aminoéthylphosphate. L'aminoéthylphosphate a été synthétisé selon la méthode utilisée pour la synthèse de la phospho-O-sérine (Neuhaus et Korkes, 1958). Le résidu guanidoéthylphosphorique correspondant à la formule brute $C_3H_9N_3O_4P$, le reste de la molécule se réduit à un groupement méthyl CH_3; le corps étudié serait alors l'acide guanidoéthyl-méthyl-phosphorique. Cependant l'hydrolyse ménagée en milieu acide ou alcalin ne nous a pas permis de mettre en évidence la formation d'acide méthylphosphorique, le groupement

méthylique étant le premier à se détacher du radical phosphorique.

Nous avons synthétisé l'acide guanidoéthyl-méthyl-phosphorique selon la méthode rapportée ci-dessous, et nous l'avons comparé au produit naturel.

SYNTHÈSE DE L'OPHÉLINE

La première étape est constituée par la synthèse de l'aminoéthylphosphate, selon la méthode employée par Neuhaus et Korkes (1958) pour la préparation de la phosphosérine à partir de la sérine et de $POCl_3$. Dans cette méthode, on transforme $POCl_3$ en $PO(OH)_2Cl$ en les décomposant dans l'eau immédiatement avant l'emploi. Pour une mole d'éthanolamine, on met en oeuvre 5 moles de $POCl_3$ et 180 ml d'eau. On verse goutte à goutte $POCl_3$ dans l'eau en agitant mécaniquement et en aspirant, par une trompe à vide, HCl dégagé. Lorsque la presque totalité de gaz chlorydrique est évacuée, on ajoute goutte à goutte l'éthanolamine en agitant énergiquement et en maintenant la température à 50-60°C. L'addition d'éthanolamine doit durer 2 heures. A la fin de l'opération, le mélange réactionnel est refroidi et additionné goutte à goutte de 72 ml d'eau. Les polyphosphates sont hydrolysés à 100°C pendant 20 min. après addition de 300 ml d'HCl 1 N. On cristallise l'aminoéthylphosphate deux fois dans l'alcool 50 % avec un rendement final d'environ 50 %. Point de fusion: 237°C.

L'aminoéthylphosphate est amidiné à froid dans l'ammoniaque à 20 % par la S-méthyl-isothiourée à raison de 2 moles pour chaque mole d'aminoéthylphosphate. Après une

SYNTHÈSE DE L'OPHÉLINE

La première étape est constituée par la synthèse de l'aminoéthylphosphate, selon la méthode employée par Neuhaus et Korkes (1958) pour la préparation de la phosphosérine à partir de la sérine et de $POCl_3$. Dans cette méthode, on transforme $POCl_3$ en $PO(OH)_2Cl$ en les décomposant dans l'eau immédiatement avant l'emploi. Pour une mole d'éthanolamine, on met en oeuvre 5 moles de $POCl_3$ et 180 ml d'eau. On verse goutte à goutte $POCl_3$ dans l'eau en agitant mécaniquement et en aspirant, par une trompe à vide, HCl dégagé. Lorsque la presque totalité de gaz chlorydrique est évacuée, on ajoute goutte à goutte l'éthanolamine en agitant énergiquement et en maintenant la température à 50-60°C. L'addition d'éthanolamine doit durer 2 heures. A la fin de l'opération, le mélange réactionnel est refroidi et additionné goutte à goutte de 72 ml d'eau. Les polyphosphates sont hydrolysés à 100°C pendant 20 min. après addition de 300 ml d'HCl 1 N. On cristallise l'aminoéthylphosphate deux fois dans l'alcool 50 % avec un rendement final d'environ 50 %. Point de fusion: 237°C.

L'aminoéthylphosphate est amidiné à froid dans l'ammoniaque à 20 % par la S-méthyl-isothiourée à raison de 2 moles pour chaque mole d'aminoéthylphosphate. Après une

nuit de contact le liquide est concentré et repris par le minimum d'eau. Le guanidoéthyl-phosphate est cristallisé deux fois dans le méthanol à 80 %. Point de fusion: 202-203°C. Teneur en phosphore: 16,9 % (Valeur théorique: 16,92 %).

L'ophéline est obtenue par condensation du sel d'argent du guanidoéthylphosphate avec l'iodure de méthyle, ce qui donne naissance à l'ester méthylique du premier. A 20 gr de guanidoéthylphosphate dissous à chaud dans 110 ml d'eau, on ajoute 18,7 gr de $AgNO_3$ dissous dans 7 ml d'eau bouillante. On obtient un abondant précipité blanc, constitué de 27 gr de sel monoargentique avec un rendement de 85 %. Il est recueilli par centrifugation et séché sous vide sur P_2O_5 à l'abri de la lumière. Il est ensuite finement pulvérisé et ajouté lentement sous agitation mécanique à 100 ml de ICH_3. Après une heure d'agitation à la température de la salle, on filtre sur verre fritté et l'on élimine le filtrat, qui donne une réaction négative à l' α-naphtol-hypobromite alcalin. Le guanidoéthyl-méthylphosphate et le guanidoéthylphosphate sont insolubles dans l'iodure de méthyle. Le précipité est extrait plusieurs fois à l'eau jusqu'à réaction négative à l' α-naphtol-hypobromite. L'extrait, qui contient les deux corps, est passé sur une colonne de mêmes dimensions et garnie de la même résine que celle employée pour la purification de l'ophéline naturelle, c'est-à-dire une colonne de 300 cm^3 (80 x 2,2) de Dowex 50 X 2 (H^+)

100-200 "mesh". Le guanidoéthyl-méthyl-phosphate se comporte exactement comme l'ophéline vis-à-vis de cette résine. Le produit synthétisé est recueilli dans les mêmes fractions que celles qui renferment l'ophéline, c'est-à-dire apres la sortie de trois fois le volume de la colonne et avant la sortie du septième. Le guanidoéthylphosphate sort beaucoup plus tard, après un volume d'effluent correspondant à huit ou neuf fois le volume de la colonne. Le corps synthétisé est cristallisé trois fois, dans les mêmes conditions que le produit naturel.

Le point de fusion est de 272-273°C et la composition élémentaire est rapportée dans le tableau IV à côté de celle du produit naturel et des valeurs théoriques.

TABLEAU IV

Le comportement en chromatographie sur papier du produit de synthèse est identique à celui de l'ophéline naturelle dans tous les solvants, comme toutes les autres propriétés déjà énumérées. Comme nous le verrons plus tard, les deux produits se comportent identiquement à l'égard de la phosphotransférase spécifique, isolée du muscle d'Ophelia neglecta.

TABLEAU IV

Composition élémentaire et point de fusion de l'ophéline naturelle et de synthèse.

	C	H	N	P	P.F.
Valeurs calculées pour la formule $C_4H_{12}O_4N_3P$	24,4	6,1	21,3	15,7	--
Valeurs trouvées pour l'ophéline naturelle	24,6	6,3	21,1	16,2	271°C
Valeurs trouvées pour le guanidoéthyl-méthyl-phosphate de synthèse	24,5	6,1	21,4	16,1	272-273°C

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU PHOSPHAGÈNE D'O. NEGLECTA

On dissèque les vers et on broie les muscles dans l'acide trichloracétique à 10 %, à raison de 2 ml par gr de tissu. Après 15 min. d'agitation à froid, on centrifuge et le résidu est réextrait par l'acide trichloracétique à 5 %, à raison de 1 ml par gr de tissu initial. Les extraits neutralisés par la soude sont réunis et amenés à pH 8-9 par la baryte et additionnés d'un excès de bromure de baryum. Toutes ces opérations sont conduites entre 0 et -5°. Après 1 h à -10°C le précipité est éliminé par centrifugation et le liquide surnageant additionné de 4 volumes d'alcool éthylique refroidi à -10°C. Après 2 h à -10°C, le précipité est recueilli, lavé, séché à l'alcool-éther. On obtient 25 mg de sel de baryum brut par gr de tissu traité, contenant environ 5 % de phosphagène.

Le corps isolé ne réagit ni avec l'α-naphtol-hypobromite alcalin, ni avec le diacétyle-α-naphtol, mais il donne la réaction des esters phosphoriques avec le réactif molybdique - SH_2. Ses Rf en présence de trois solvants diffèrent de ceux des autres phosphagènes et de l'ophéline. Ils sont rapportés dans le tableau V. Après hydrolyse par HCl 0,1 N à 100°C pendant 1 min., il libère de l'acide orthophosphorique et de l'ophéline: cette dernière a été décelée par sa réaction

avec l' α-naphtol-hypobromite et identifiée par chromatographie sur papier. Les concentrations moléculaires des deux produits d'hydrolyse ont été déterminées par les méthodes de Briggs (1922) pour la première, et au diacétyle-α-naphtol (Rosenberg, Ennor et Morrison, 1956) pour la seconde. Le rapport est égal à 1:1. Ces faits indiquent que le sel de baryum isolé est un dérivé phosphorique présentant la même labilité que les autres phosphagènes et dans lequel l'ophéline est substituée en N'-amidinique par un reste phosphorylé. Comme nous verrons[4] plus tard, un enzyme isolé du muscle d'O. neglecta et ayant des propriétés analogues à celles des phosphotransférases déjà connues, est capable de transférer sur l'ADP le phosphore labile de notre corps avec libération de l'ophéline.

TABLEAU V

TABLEAU V

Valeurs des Rf de la phosphophéline dans différents solvants, sur papier Whatman n. 540, à 21°C. Chromatographie descendante.

Solvants	Rf
n-butanol-éthanol-eau (40:15:35)	0,1
n-propanol-ammoniaque à 20%-eau (60:30:10)	0,17
Pyridine-éthanol-ammoniaque à 20%-eau (30:30:30:10)	0,26

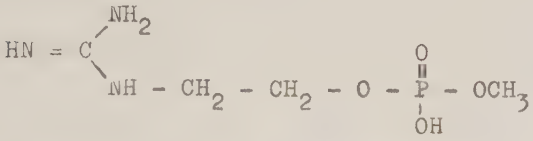
SYNTHÈSE DE LA PHOSPHO-OPHÉLINE

L'ophéline est dissoute dans l'eau, à raison de 1 ml pour chaque mmole, additionnée de NaOH 17 N à raison de 0,1 ml/mmole et placée dans un bain de glace sous agitation mécanique. On ajoute goutte à goutte et, dans l'ordre, pour chaque mmole d'ophéline: 1,1 ml de NaOH 17 N, 3 ml de H_2O et 0,2 ml de $POCl_3$ fraichement distillé, et laisse réagir 15 min. Cette série d'additions est répétée encore 3 fois. On ajoute ensuite 1,1 ml de NaOH, puis 3 ml de H_2O. Pendant toute la durée de l'opération, la température est maintenue à 0°C et le pH au-dessus de 8. Après 30 min., le mélange réactionnel est essoré à -10°C sur filtre en verre fritté à double paroi, réfrigéré avec de l'alcool à -10°C. Le précipité de phosphate trisodique est lavé à l'eau glacée et filtré à nouveau. Les deux filtrats réunis sont neutralisés par HCl jusqu'à pH 7,6 et le volume mesuré. Après addition d'un volume d'éthanol, ils sont laissés à -10°C pendant une nuit, on filtre le précipité formé, qu'on lave rapidement à l'eau glacée. Le filtrat et le liquide de lavage sont réunis, additionnés de 6,5 gr de Br_2Ba dissous dans 6,5 ml d'eau et d'un demi-volume d'éthanol. Après une nuit à -10°C on recueille le précipité, puis on l'analyse, avant et après hydrolyse, à 100°C pendant 1 min. dans HCl 0,1 N, à l'aide du réactif de

Briggs pour l'ion orthophosphorique et du réactif de Rosenberg pour le groupement guanidique. Avant l'hydrolyse, la réaction de Rosenberg est négative et la quantité de phosphore minéral est négligeable, inférieure à 1 % de la quantité de phosphore labile trouvée après hydrolyse. Après hydrolyse, le rapport entre les concentrations moléculaires du phosphore labile et du dérivé guanidique est égal à 1:1. La guanidine monosubstituée libérée est facilement identifiable à l'ophéline par chromatographie. Pourtant, l'analyse chromatographique descendante du produit de phosphorylation chimique non traité par l'acide révèle, à côté de la tache de mêmes Rf que le phosphagène isolé d'O. neglecta, une seconde tache présentant les Rf suivants, à 21°C sur papier Whatman n° 540: n-butanol-éthanol-eau (40:15:35) : 0,10; n-propanol-ammoniaque-eau (60:30:10) : 0,10; pyridine-éthanol-ammoniaque-eau (30:30:30:10) : 0,18. Les produits correspondants aux deux taches ont été isolés par chromatographie préparative en pyridine-éthanol-ammoniaque-eau (30:30:30:10) : le premier se comporte chromatographiquement comme le phosphagène isolé d'O. neglecta; le second a tendance à se transformer en le premier. L'hydrolyse des deux produits donne également naissance à l'ophéline avec un rapport ophéline/phosphore libéré égal à 1. Il semble, comme nous le discuterons plus loin, que nous sommes en présence de deux formes d'un même phosphagène.

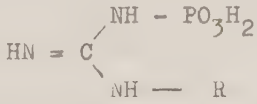
DISCUSSION

Nos résultats montrent que l'ophéline est l'acide guanidoéthyl-methyl-phosphorique :

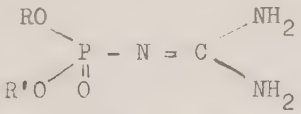


corps inconnu jusqu'à présent. Le phosphagène d'O. neglecta est l'acide N'-phosphoryl-guanidoéthyl-méthylphosphorique.

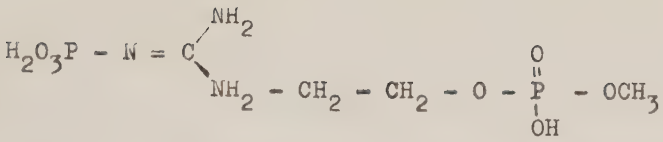
Il est habituel de représenter les phosphoryl-guanidines avec la formule générale qui traduit le caractère d'une guanidine disubstituée symétrique :



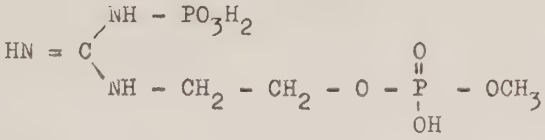
Selon Clark et Warren (1963) l'étude à l'infrarouge et au spectre de résonance magnétique nucléaire montre qu'en fait les esters d'acide phosphorylguanidique sont de la forme :



En admettant que les résultats de Clark et Warren soient extrapolables aux phosphagenes qui sont des guanidines disubstituées et non monosubstituées, ce qui n'est pas prouvé, la phospho-ophéline serait de la forme :

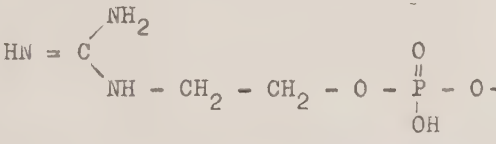


Le fait que le produit correspondant à la seconde tache chromatographique ne donne pas non plus de réaction positive au diacétyle-α-naphtol, réactif des guanidines monosubstituées et disubstituées asymétriques comme la créatine, laisse supposer que le produit secondaire de la phosphorylation chimique de l'ophéline serait de la forme :



tautomère du produit naturel.

Il est très intéressant de noter que l'ophéline aussi bien que la lombricine, qui sont respectivement les bases des phosphagènes dans O. neglecta et O. bicornis possèdent un radical commun, le guanidoéthylphosphate :



auquel est attaché, soit un groupement CH_3, soit $-CH_2CHNH_2COOH$.

Il serait intéressant d'établir si le précurseur métabolique de l'ophéline est un dérivé aminé, l'aminoéthyl-

méthyl-phosphate, qui est ensuite amidiné, comme dans le cas de la lombricine (Rossiter, Gaffney, Rosenberg et Ennor, 1960), ou un dérivé guanidique, le guanidoéthylphosphate, qui est ensuite méthylé.

CHAPITRE III

ATP : OPHÉLINE PHOSPHOTRANSFÉRASE

Il est prouvé jusqu'à présent qu'à chaque type de phosphagène correspond une phosphotransférase spécifique de celui-ci. Il en est de même pour la phosphophéline. La réaction réversible

$$\text{ATP} + \text{ophéline} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{phospho-ophéline} + \text{ADP}$$

est catalysée par un enzyme spécifique extrait des muscles d'*O. neglecta* dont nous allons examiner la méthode de préparation et de purification et étudier la spécificité et les propriétés générales.

TECHNIQUES

L'activité enzymatique est déterminée par la mesure du phosphore labile transféré de l'ATP à l'ophéline, dans le sens direct de la réaction (1), et de la phospho-ophéline à l'ADP, dans le sens inverse (2). Généralement le milieu réactionnel est de 1 ml et contient, pour la réaction directe, ophéline, ATP et Mg^{++} 5.10^{-3} M, du tampon glycine 0,2 M pH = 8,5 et de 5 à 100 µg de protéine enzymatique, selon le

stade de la purification de celle-ci. Dans le cas de la réaction inverse le milieu contient phospho-ophéline 10^{-3} M, ADP et Mg^{++} 5.10^{-3} M, tampon glycine 0,2 M de pH = 6,8 et de 4 à 40 mg de protéine enzymatique. La concentration de ~~métal~~ Mg^{++} est toujours égale à celle de l'ATP ou de l'ADP. La solution enzymatique renfermant Mg^{++} 0,01 M est ajoutée, après 5 min. de préincubation, à la température choisie. Toutes les solutions autres que les tampons sont rigoureusement préparées à pH 7, les solutions d'ATP ou de phosphagène sont fraîchement préparées et conservées à 0°C. L'incubation dure généralement 5 min., on ajoute ensuite 0,1 ml d'HCl N pour chaque ml de liquide incubé; les essais sont portés à 100°C pendant 1 min., vivement refroidis ensuite à 0°C et le phosphore est dosé selon la méthode de Briggs (1922). La quantité de phosphore transféré est obtenue par différence entre l'essai et un témoin qui ne contient pas l'accepteur, dans le cas de la réaction directe, entre l'essai et un contrôle qui ne contient pas l'enzyme, dans le cas de la réaction inverse.

Les conditions appropriées pour obtenir la vitesse initiale sont étudiées chaque fois qu'un facteur dans la réaction est modifié : on rapporte sur des coordonnées cartésiennes la quantité de phosphore transféré en fonction, soit de la concentration en protéines enzymatiques, soit du temps. Généralement la vitesse de la réaction est toujours constante avant que les 10-20 % du phosphore labile soit transférés.

Les mesures de la concentration en protéine sont réalisées par lecture aux U.V. selon la formule (Layne, 1957) :

$$\text{mg protéines/ml} = 1{,}55 D_{280} - 0{,}76 D_{260}$$

L'ATP et l'ADP employés sont des produits commerciaux recristallisés dans notre laboratoire. Nous avons employé l'ophéline de synthèse après avoir fait des essais comparatifs avec les produits naturels.

La phosphophéline de synthèse, dont le comportement vis-à-vis de l'enzyme n'a pas pu être comparé à celui du produit naturel, obtenu en trop faible quantité, a été également utilisée pour la réaction inverse.

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ENZYME

Les muscles d'*O. neglecta* aussitôt disséqués sont portés à 0°C et broyés dans KCl 0,01 N à raison de 3 ml pour chaque gr de tissu. Après 15 min. d'extraction, l'homogénat est centrifugé à 0°C à 7000 x g pendant 10 min. et le résidu réextrait 15 min. dans 1 ml et demi de KCl 0,01 N pour chaque gr de tissu. Les deux extraits filtrés et réunis sont fractionnés entre 0,55 et 0,75 de saturation en $(NH_4)_2SO_4$: les fractions précipitées à 0,55 ou solubles à 0,75 ne contiennent pratiquement pas d'activité phosphotransférasique qui se trouve, par contre, dans la fraction centrale. La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter à la solution protéique pour obtenir le degré de saturation désiré est calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{0,1\ G\ (S_2 - S_1)}{1 - \frac{VG}{1000}\ S_2}$$

où X est le poids, en grammes, de sel à ajouter à 100 ml de solution à un degré de saturation S_1 pour l'amener au degré de saturation S_2, G la quantité en grammes du même sel contenue dans 100 ml de solution saturée et V son volume spécifique apparent dans la solution saturée. Nous avons adopté les valeurs V et G données dans les International Critical Tables of Numerical Data (National Research Council, 1928).

La fraction protéique ainsi obtenue est conservée en suspension dans 1 ml de $(NH_4)_2SO_4$, à 0,8 de saturation par gramme de tissu. Avant chaque série d'expériences, 5 ml de cette suspension sont centrifugés et le précipité dissous dans 5 ml d'acétate de magnésium 10^{-2} M à pH 7, la solution est ensuite additionnée de 23 mg de gel d'hydroxyapatite (Tiselius, Hjertén et Levin, 1956), agitée pendant 15 min. puis centrifugée.

L'enzyme est précipité du liquide surnageant par 20 ml de $(NH_4)_2SO_4$ saturé, à pH 7, repris par 0,5 ml d'une solution d'acétate de magnésium 10^{-2} M et passé à 0°C à travers une colonne (38 x 0,9 cm) de Sephadex G 100 au tampon glycine à pH 8,3 contenant KCl et acétate de magnésium 10^{-2} M. L'effluent est recueilli sur un collecteur de fractions à 0°C par fractions de 2 ml; celles-ci sont diluées à 1/7,5 et l'on détermine leur absorption à 280 et à 260 mμ ainsi que leur activité.

Fig. 4

L'activité enzymatique et les valeurs des lectures à 280 et à 260 mμ des différentes fractions d'effluent de Sephadex sont rapportées dans la fig. 4 en fonction du volume de l'effluent. Le protocole de purification est schématisé dans le tableau VI.

TABLEAU VI

TABLEAU VI

Purification de l'adénosine-5'-triphosphate:ophéline phosphotransférase. Matériel de départ: 30 gr de muscle d'*O. neglecta* provenant de 80 individus. La vitesse initiale de la réaction directe à 30°C est mesurée après 5 min. d'incubation dans 1 ml du mélange suivant: ophéline, ATP et Mg^{++} 5×10^{-3} M; tampon glycine-NaOH 0,2 M à pH 8,5; solution enzymatique 0,1 ml. Dans les deux dernières colonnes on a attribué arbitrairement les valeurs de 1 et de 100 aux résultats obtenus après la première purification. Celles de l'extrait brut ne peuvent être mesurées car la présence de l'ATP-ase rend difficiles les déterminations exactes de l'activité.

Traitements		Quant. totale de prot. (mg)	Activité spécif. µmoles de P transf. x $ml^{-1} x min^{-1} x mg^{-1}$	Purific.	Activité récupérée
Précipitation au sulfate d'ammonium cristallisé		270	3,0	1	100
Absorption sur gel Tiselius		189	4,0	1,3	95
Précipitation au sulfate d'ammonium saturé		99	6,6	2,2	80
Passage sur	Fract. 4	26,5	4,4	---	
Sephadex G-100	" 5	29,7	11,0	3,7	21
	" 6	13,2	1,4	---	

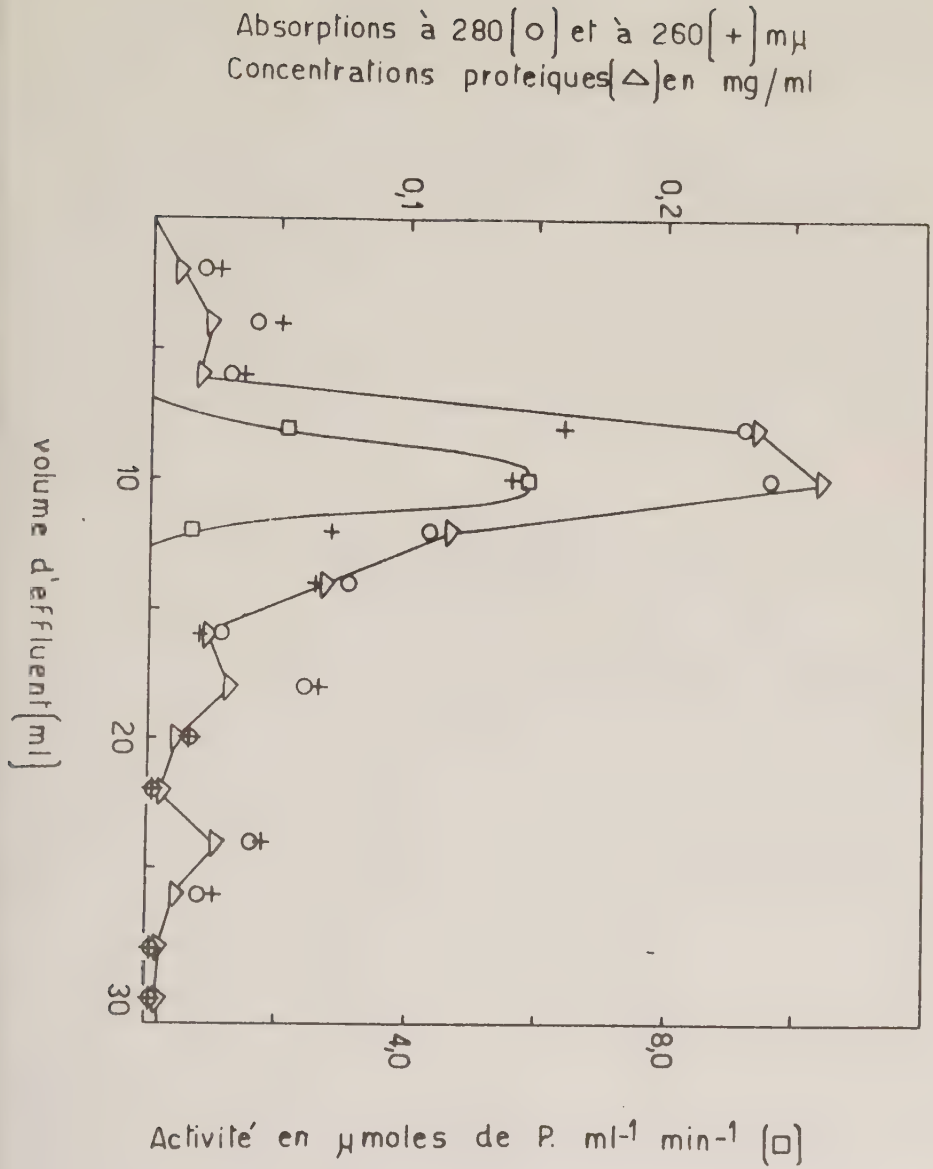


Fig. 4 - Diagramme de filtration de l'extrait de muscle d'*O. neglecta*, précipité deux fois au sulfate d'ammonium, adsorbé sur gel Tiselius et passé à travers Sephadex G 100 (0,4 ml contenant 33 mg de protéines par ml).
Abscisses: volume d'effluent; ordonnées: absorption à 280 et 260 mμ et concentration protéique (échelle de gauche), activité totale contenue dans chaque fraction (échelle de droite)

L'enzyme est stable. Nous avons retrouvé son activité intacte après conservation de deux semaines à 0°C en suspension dans $(NH_4)_2SO_4$ après la première précipitation. S'il est conservé par la suite à 0°C à pH 7 en solution de 80 µg/ml en présence de Mg^{++} 10^{-2} M, son activité ne change pratiquement pas après 18 h; elle est réduite à 45 % après 3 jours.

PH_ ET_ TEMPÉRATURE _OPTIMA

Nous avons étudié les variations d'activité de l'enzyme en fonction des variations du pH et de la température. L'intervalle de pH exploré est de 7,5 à 9,5 pour la réaction directe de transfert, de 6,1 à 8,5 pour la réaction inverse. Les courbes d'activité en fonction du pH sont représentées sur la fig. 5. Les valeurs optima trouvées sont de 8,5 dans le premier cas et de 6,8 dans le second. L'intervalle de température exploré au pH optimum est de 20° à 35°C pour la réaction directe et de 23° à 40°C pour la réaction inverse. Les résultats sont rassemblés dans les deux courbes d'activité,en fonction de la température,de la fig. 6. Les valeurs optima trouvées sont 30°C pour la réaction directe et 35°C pour la réaction inverse.

Fig. 5 et 6.

Tous les essais d'activité dans les deux sens de la réaction, qui seront décrits ensuite, ont été conduits aux pH et températures optima.

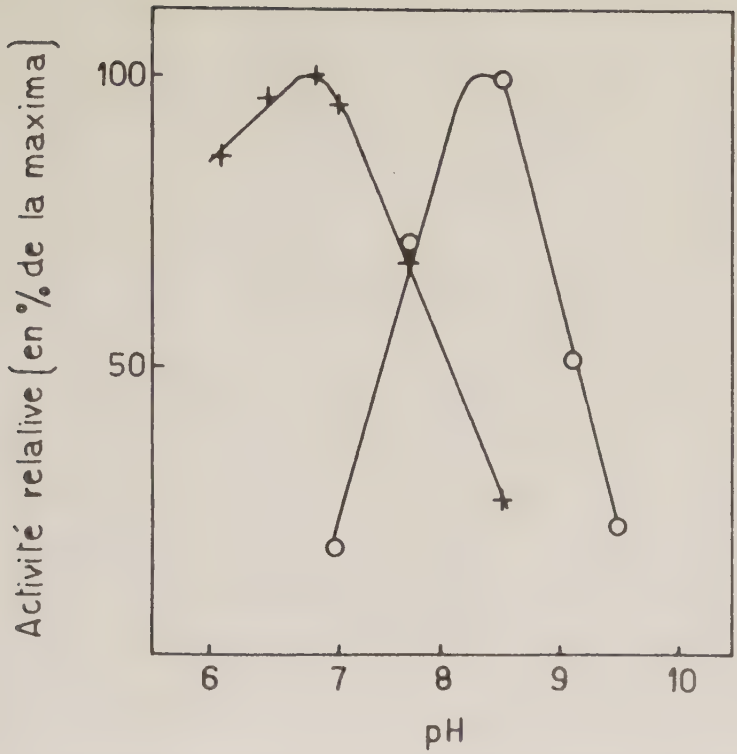


Fig. 5 - Vitesse initiale de la réaction directe (0-0) et de la réaction inverse (+++) en fonction du pH.

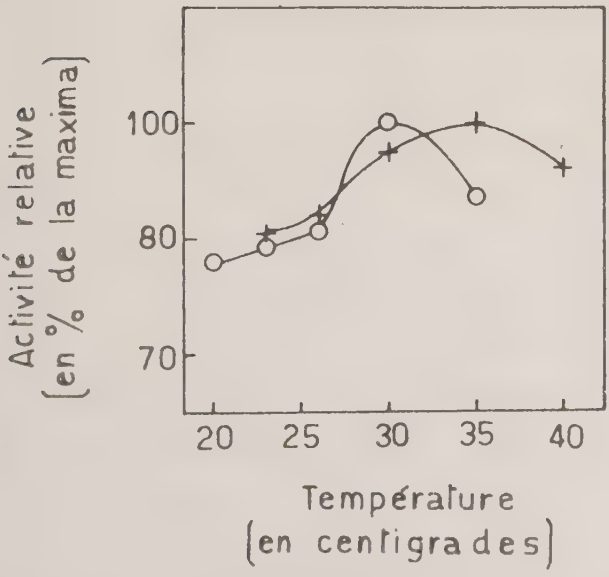


Fig. 6 - Vitesse initiale de la réaction directe (0-0) et de la réaction inverse (+++) en fonction de la température.

ETUDE CINÉTIQUE

Nous avons étudié la variation de la vitesse initiale de transphosphorylation en fonction de la concentration en substrat. Pour cela nous avons mesuré la vitesse initiale de transphosphorylation dans les séries d'essais contenant des concentrations croissantes d'ophéline ou de phosphophéline en présence d'un excès d'ATP ou d'ADP, respectivement, et dans d'autres séries avec des concentrations croissantes d'ATP ou d'ADP en présence d'un excès d'ophéline ou de phosphophéline respectivement. En rapportant l'inverse des valeurs obtenues en fonction de l'inverse des concentrations moléculaires des substrats selon Lineweaver et Burk (1934) nous avons calculé les constantes de Michaelis et les vitesses maxima.

Figure 7

Les diagrammes tracés selon Lineweaver et Burk pour la réaction directe sont rapportés dans la fig. 7, tandis que ceux relatifs à la réaction inverse sont comparés dans la fig. 8 à ceux de la phosphotaurocyamine, le seul phosphagène sensible à l'enzyme parmi ceux disponibles au moment de ces recherches, en dehors de son substrat naturel. Dans le tableau VII sont rassemblées les valeurs des constantes de Michaelis et des vitesses maxima de réaction. K_m présente les valeurs les plus petites pour les substrats de la réaction inverse,

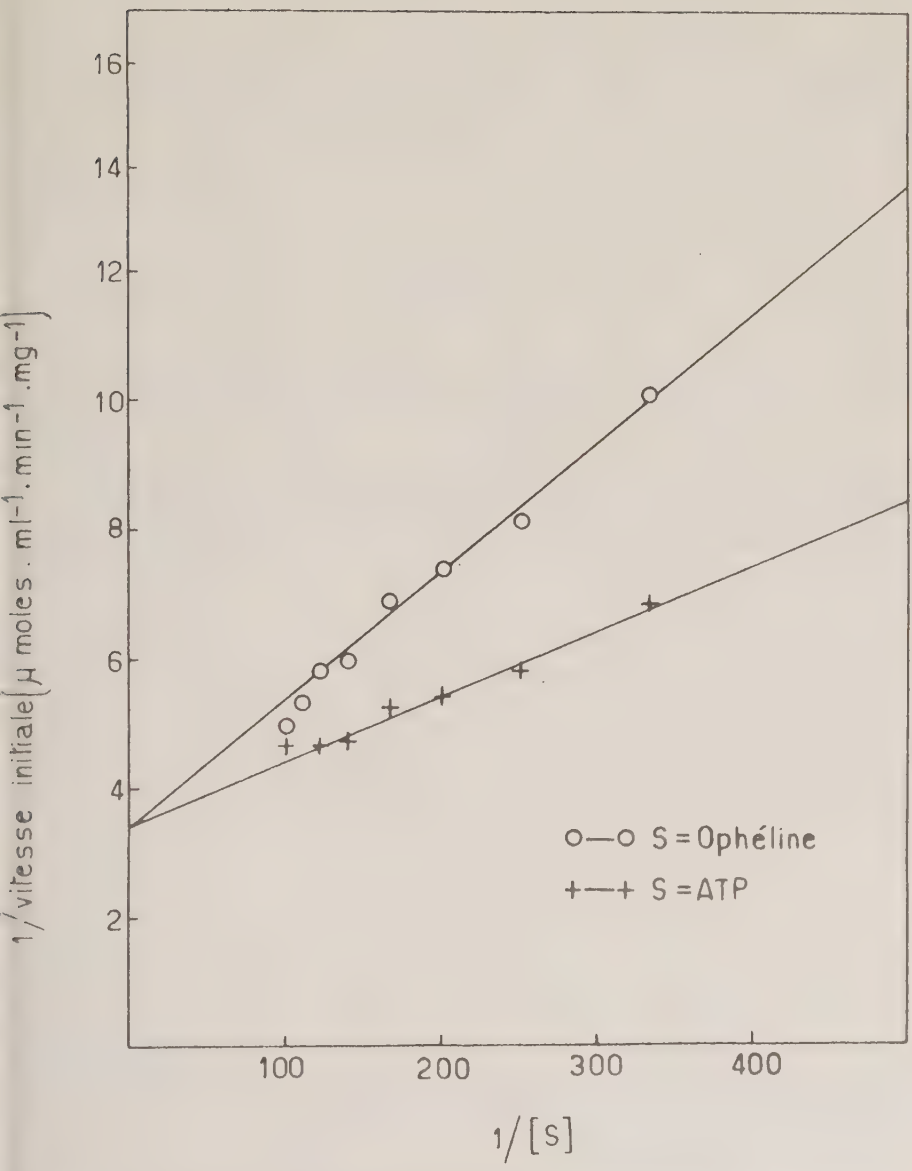


Fig. 7 - Influence de la concentration des substrats sur la vitesse initiale de la réaction directe.

ce qui montre que l'équilibre de la réaction est nettement à faveur de la déphosphorylation du phosphagène et de la résynthèse de l'ATP.

TABLEAU VII

Constantes de Michaelis et vitesses maxima de l'ATP : ophéline phosphotransférase.

(Accepteur de phosphore: l'ophéline dans le cas de l'ATP, l'ADP dans le cas de la phosphoophéline. Donneur de phosphore: la phosphoophéline dans le cas de l'ADP, l'ATP dans le cas de l'ophéline).

Substrats	K_m (mM)	V (μmoles.ml^{-1}.min^{-1}.mg^{-1})
ATP	3	31,6
Ophéline	5,8	31,6
ADP	0,85	19,6
Phosphoophéline	1,1	19,6

Nous avons tenté de calculer l'ordre de grandeur de la constante d'équilibre et de l'énergie libre de transphosphorylation de notre réaction entre les intervalles de 30-35°C et à pH 7-8, pour établir une comparaison avec les valeurs correspondantes connues de certains autres phosphagènes. Dans ce but, nous avons employé la formule connue d'Haldane qui donne la constante d'équilibre K_{eq} en fonction des constantes de Michaelis (K) et des vitesses maxima (V) dans les deux sens de la réaction :

$$K_{eq} = \frac{V_1 \cdot K_2}{V_2 \cdot K_1}$$

En prenant les valeurs expérimentales du tableau VII nous avons :

$$K_{eq} = \frac{31,6 \times 1,1}{19,6 \times 5,8} = 0,3$$

Cette valeur de constante apparente d'équilibre pour la réaction de conversion de l'ophéline en phosphophéline est assez proche de celles déjà trouvées pour la conversion analogue de quelques autres phosphagènes (Lehmann, 1936; Noda, Kuby et Lardy, 1954; Pradel et Thoai, 1960; Pradel, 1962).

On donne généralement l'énergie libre standard de conversion du phosphagène en base guanidique libre. En prenant l'inverse de la valeur de K_{eq} trouvée, le calcul effectué selon la formule connue

$$F^o = RT \ln \frac{1}{0,3}$$

donne pour résultat $F^o = -730$ environ. La valeur approximative obtenue permet de placer la phosphoophéline entre la phosphocréatine d'une part, et la phosphoarginine et la phosphotaurocyamine d'autre part.

SPÉCIFITÉ

L'enzyme n'est actif ni sur la créatine, ni sur l'arginine, ni sur la glycocyamine, ni sur les phosphagènes correspondants; il présente une très faible activité vis-à-vis du guanido-éthanol et de l'acide guanido-propionique, une activité plus forte vis-à-vis des acides guanido-butyrique et guanidoéthylphosphorique et une activité sur la taurocyamine, la lombricine, et la phosphotaurocyamine qui, à certaines concentrations de ces substrats, est comparable à celle qu'il exerce vis-à-vis de l'ophéline.

Fig. 8 et 9

Pour les substrats les plus sensibles, nous avons étudié les variations de la vitesse initiale de transphosphorylation en fonction de leur concentration. Les résultats sont rapportés dans les fig. 8 et 9 et dans le tableau VIII, où l'on a rassemblé les valeurs des constantes de Michaelis et des vitesses maxima, relatives à divers substrats, dont le substrat naturel de l'enzyme, l'ophéline.

TABLEAU VIII

Un examen comparatif de ce tableau et du tableau VII permet de constater que la constante de Michaelis pour la réaction directe présente sa valeur la plus petite lorsque

Fig. 8. Influence de la concentration des substrats sur la vitesse initiale de la réaction inverse.

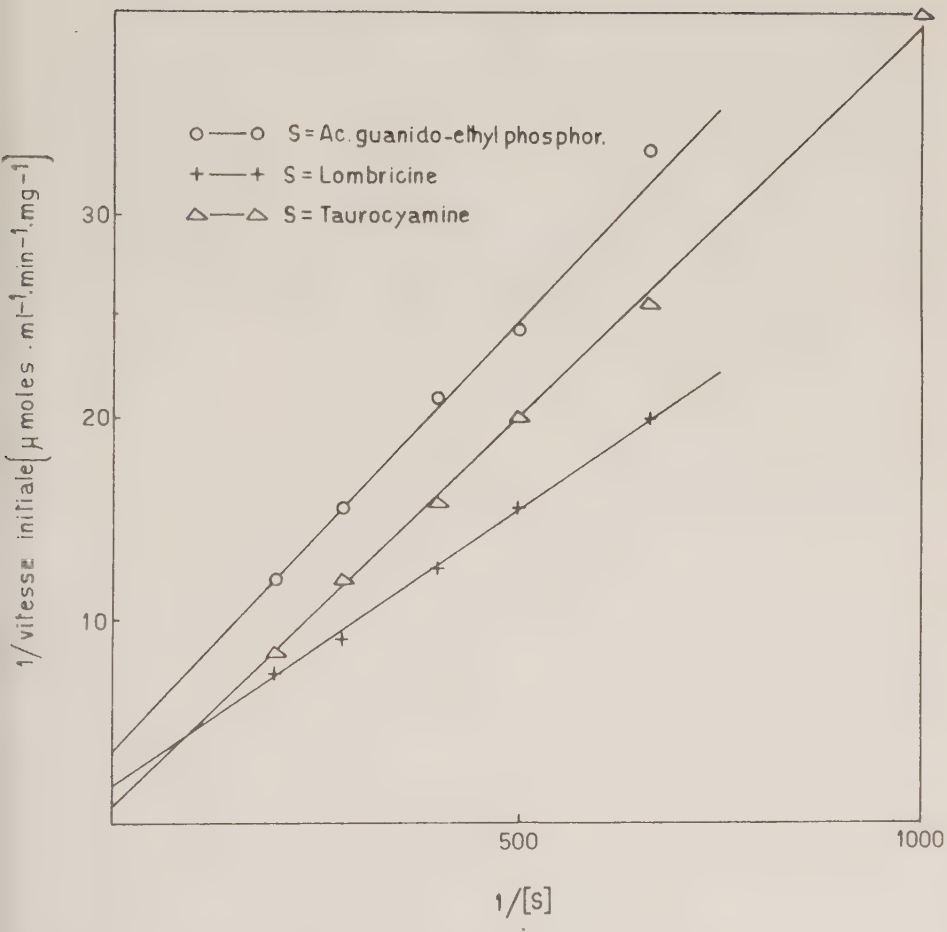


Fig. 9 - Influence de la concentration de différents substrats sur la vitesse initiale de la réaction directe.

l'accepteur du phosphore de l'ATP est l'ophéline; sa valeur est la plus élevée dans le cas des autres accepteurs; l'affinité de l'enzyme pour ces derniers est donc inférieure à celle mesurée pour l'ophéline. De même, pour la réaction inverse, la valeur de K_m de la phosphoophéline est inférieure à celle de la phosphotaurocyamine. Pour l'ophéline comme pour la taurocyamine, c'est dans la réaction inverse que K_m présente ses valeurs les plus petites.

TABLEAU VIII

Constantes de Michaelis et vitesses maxima de l'ATP : ophéline phosphotransférase pour différents substrats (Accepteur du phosphore de la phosphotaurocyamine : l'ADP. Donneur de phosphore dans les autres cas : l'ATP).

Substrats	K_m (mM)	V (μmoles.ml^{-1}.min^{-1}.mg^{-1})
Ac. guanidoéthylphosphorique	13	29,8
Lombricine	15	59,6
Taurocyamine	50	134,0
Phosphotaurocyamine	1,8	38,4

INHIBITEURS

L'ophéline/phosphotransférase est inhibée fortement par les réactifs des groupements -SH. Nous avons étudié l'action de différentes concentrations d'acide monoiodoacétique (AIA), de N-éthylmaléimide (NEM), de chloroacétophénone (CAP) et de p-chloromercuribenzoate (PCMB) sur la réaction directe, en ajoutant ces divers produits eu milieu réactionnel 30 sec. avant l'addition de l'enzyme. Les quatre substances sont toutes des inhibiteurs efficaces, les dernières plus que les premières. Les résultats sont rassemblés dans le tableau IX. Dans la réaction inverse nous avons essayé l'action inhibitrice du PCMB et de l'hydroxylamine. Le premier provoque déjà à la concentration de 10^{-8}M une inhibition de 80 %, la seconde une inhibition de 90 % à 10^{-5}M.

TABLEAU IX

TABLEAU IX

Influence de diverses concentrations d'inhibiteurs sur l'activité de l'ATP : ophéline phosphotransférase.

RÉACTION DIRECTE

Concentration d'inhibiteurs	Inhibition relative (% d'activité perdue)			
	AIA	NEM	CAP	PCMB
10^{-7}M	--	10	16	72
10^{-4}M	30	35	66	90
10^{-3}M	53	79	94	95
10^{-2}M	98	--	--	--

RÉACTION INVERSE

Inhibiteurs et leur concentration	Inhibition relative (% d'activité perdue)
NH_2OH à 10^{-5}M	90
PCMB à 10^{-8} M	80

DISCUSSION

La présence d'activité ATP-asique dans les extraits bruts d'O. neglecta rend impossible une évaluation quantitative exacte de l'activité ophéline-phosphotransférasique avant la première précipitation au sulfate d'ammonium. Aussi l'enrichissement en activité au cours de la purification a-t-il toujours été calculé d'après celle du produit de la première précipitation. Celle-ci, opérée dans des conditions standard rigoureuses, donne des résultats tres satisfaisants : elle élimine complètement l'activité ATP-asique et conserve une bonne activité phosphotransférasique. A partir de la première précipitation l'activité spécifique augmente encore quatre fois au cours de notre purification.

Nous avons vérifié que la répétition, dans les mêmes conditions, du fractionnement au sulfate d'ammonium cristallisé ne donnait aucun avantage sensible; nous avons donc préféré procéder, immédiatement apres la première précipitation, à des opérations d'adsorption et de précipitation alternées, pour obtenir un meilleur rendement et une plus grande purification; ceci est en accord avec les vues les plus modernes sur le fractionnement des protéines en général et des protéines enzymatiques en particulier (Dixon et Webb, 1961).

Notre enzyme présente des propriétés assez analogues à celles des autres ATP : guanidine phosphotransférases déjà étudiées, elle est activée par Mg^{++} et inhibée par les réactifs des groupements -SH; de même les valeurs de la température et du pH optimum sont assez voisines (Rabin et Watts, 1960; Griffiths, Morrison et Ennor, 1957; Pant, 1959; Rosenberg, Rossiter, Gaffney et Ennor, 1960; Kuby, Noda et Lardy, 1954; Noda, Nihei et Morales, 1960; Rosenberg et Ennor, 1955; Pradel, 1962; Thoai et Pradel, 1962a).

L'action inhibitrice de l'hydroxylamine sur la réaction inverse du transport phosphorique sur l'ophéline semble montrer que les sites actifs de l'enzyme sont analogues à ceux d'autres phosphokinases (Pradel, 1962; Thoai et Pradel, 1962b; Thoai, Kassab et Pradel, 1963).

Par contre, l'étude de la spécificité de l'enzyme à l'égard de divers phosphagènes montre clairement que l'ophélinekinase est différente de toutes les autres ATP-guanidine phosphotransférases déjà décrites. Elle est inactive sur la créatine, la phosphocréatine, l'arginine, la phosphoarginine, la glycocyamine, la phosphoglycocyamine; malheureusement nous n'avons pu l'expérimenter sur l'hypotaurocyamine, la phosphohypotaurocyamine, la phospholombricine. Avec le guanido-éthylphosphate, la lombricine, la taurocyamine, la phosphotaurocyamine, on obtient une certaine activité comme avec d'autres substrats tels le guanidoéthanol et les acides γ-guanidobutyrique et guanidopropionique.

Les constantes de Michaelis de notre enzyme pour la taurocyamine, la phosphotaurocyamine, présentent respectivement les valeurs de $50x10^{-3}M$ et de $1,8x10^{-3}M$, tandis qu'avec l'enzyme spécifique de la taurocyamine et de la phosphotaurocyamine on a trouvé respectivement les valeurs suivantes: $7x10^{-3}M$, $1x10^{-2}M$ (Pradel et Thoai, 1960; Pradel, 1962). Malheureusement nous ne connaissons pas encore les valeurs de K_m correspondantes pour la lombricine phosphotransférase pour pouvoir les comparer aux K_m de l'ophéline phosphotransférase vis-à-vis de la lombricine. La structure des différents substrats qui, avec la lombricine, la taurocyamine et la phosphotaurocyamine, nous ont donné des résultats positifs sur l'action de notre enzyme, suggère quelques idées sur les conditions auxquelles est liée son activité, simples hypothèses car le nombre de substrats étudiés est faible.

L'activité de l'ophéline phosphotransférase semble liée à la présence dans le substrat d'un groupement guanidique et d'un oxhydrile séparés par une courte chaîne aliphatique (deux ou même trois atomes de carbone). L'oxhydrile peut être porté par un atome de P (cas de l'ophéline, du guanidoéthylphosphate et de la lombricine) ou de S (cas de la taurocyamine) ou même par un atome de carbone (cas des acides guanidobutyrique, guanidopropionique et guanidoéthanol). Le fait que l'oxhydrile appartient à un groupement acide renforce l'activité, qui est encore plus forte si ce groupement acide est lié par un pont -O- à la chaîne aliphatique, comme dans le cas des esters phosphoriques du guanidoéthanol.

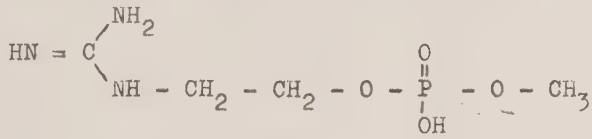
CONCLUSIONS

Nous avons observé l'existence de différences vraiment remarquables dans la composition en guanidines monosubstituées des deux espèces du genre Ophelia, O. bicornis et O. neglecta. La guanidine musculaire, qui est généralement la base du phosphagène, est différente dans ces deux espèces de polychètes sédentaires. Le muscle d'O. bicornis contient la lombricine, dérivé guanidique qui n'a été trouvé jusqu'à présent que chez les Oligochètes, comme constituant du phosphagène musculaire. Dans le muscle d'O. neglecta nous avons mis en évidence une nouvelle base guanidique monosubstituée que nous avons appelée ophéline. Cette base existe à l'état libre et à l'état de phosphagène dans le muscle.

La présence de phosphagènes différents dans le muscle d'animaux d'un même genre a été établie pour la première fois dans ce travail. De plus les phosphagènes des deux espèces d'Ophelia diffèrent d'autres phosphagènes musculaires présents chez d'autres animaux de genres divers appartenant à la même famille d'Ophelidae, comme la phosphocréatine et la phosphoarginine trouvées récemment dans le muscle de Travisia forbesii Johnston (Thoai, Robin, di Jeso, Pradel et Kassab, 1963). Ces résultats contrastent avec l'opinion courante selon

laquelle la distribution des phosphagènes chez les animaux suit un ordre phylogénétique.

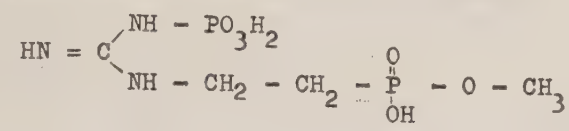
La lombricine, l'ophéline et la phosphophéline ont été mises en évidence et identifiées non seulement par analyse chromatographique, mais chacun des trois corps a été isolé purifié, cristallisé et l'on a déterminé le point de fusion et la composition élémentaire des deux guanidines. Dans le cas de l'ophéline, il a été nécessaire d'en déterminer la structure et nous y sommes parvenus en identifiant les produits de son hydrolyse, puis en réalisant sa synthèse par voie chimique. Les résultats des analyses répétées sur le produit de synthèse purifié et cristallisé, comparés à ceux obtenus avec le produit naturel, ont confirmé la structure prévue pour l'ophéline, ou acide guanidoéthyl-méthyl-phosphorique, corps inconnu jusqu'à présent.



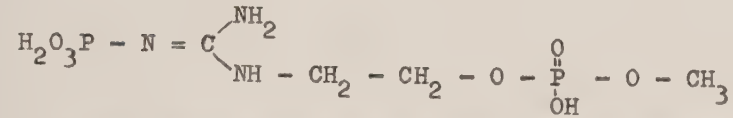
Cette formule diffère de celle de la lombricine, ou acide guanidoéthyl-séryl-phosphorique, par remplacement du groupement méthyle de la première par un radical séryl de la seconde.

Le phosphagène de l'ophéline a été préparé par synthèse et le produit synthétisé comparé au produit naturel.

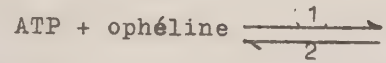
La formule du nouveau phosphagène, qui s'ajoute aux six autres phosphagènes naturels déjà connus, est celle de l'acide N'-phospho ryl-guanidoéthyl-méthyl-phosphorique :



ou



Nous avons isolé et purifié, à partir du muscle d'Ophelia neglecta, l'enzyme spécifique qui catalyse la reaction reversible :



Cet enzyme, que nous avons appelé ATP:ophéline phosphotransférase selon la terminologie adoptée par la "Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie", est assez stable; il peut conserver son activité intacte pendant quelques semaines à 0°C. Il est activé par Mg^{++}. Les valeurs de pH et de température optimum d'action sont respectivement 8,5 et 30°C pour la réaction directe (1) et 6,8 et 35°C pour la réaction inverse (2). Nous avons trouvé 31,6 µmoles par ml, par min. et par mg. de proteines enzymatiques comme valeur de la vitesse maxima pour la réaction directe et 19,6 pour la réaction inverse; K_m est egal à 3 mM pour l'ATP, 5,8 mM pour l'ophéline, 0,5 mM pour l'ADP et 1,1 mM pour la phospho-ophéline.

L'enzyme présente une certaine affinité pour des produits de structure analogue à celle du substrat naturel, comme l'acide guanidoéthylphosphorique et la lombricine, mais l'affinité pour l'ophéline est toujours bien supérieure. L'enzyme est actif sur

d'autres substrats : la taurocyamine et la phosphotaurocyamine, et, à un degré plus bas, les acides guanidoéthyl-phosphorique, guanidobutyrique et guanidopropionique, et le guanidoéthanol. Il est inactif sur la créatine, l'arginine, la glycocyamine et les phosphagènes respectifs.

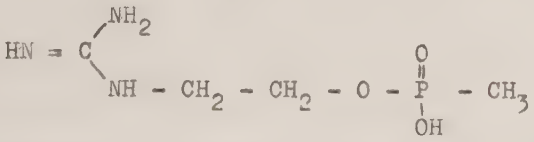
L'inhibition de l'enzyme par le p-chloromercuribenzoate, la chloroacétophénone, la N-éthylmaléimide et le monoiodoacétate indique la présence de groupes -SH réactifs comme pour les autres ATP:guanidino phosphotransférase. De même l'inhibition par NH_2OH suggère la présence de groupes amides réactifs comme il a été indiqué par les autres enzymes du même type (Thoai et Pradel, 1962; Thoai, Kassab et Pradel, 1963).

Le comportement vis-à-vis de ces inhibiteurs, des ions Mg^{++}, du pH, de la température, et sa stabilité, sont analogues pour notre enzyme et les autres ATP:guanidophosphotransférases décrites jusqu'à ce jour, à savoir la créatine-, l'arginine-, la glycocyamine-, la taurocyamine-, la lombricine-, l'hypotaurocyamine-phosphotransférases.

RÉSUMÉ

1°.- Un nouveau dérivé guanidique a été isolé du muscle d'Ophelia neglecta Schneider, purifié sur colonne de résine échangeuse d'ions et obtenu à l'état cristallisé. Le corps auquel on a donné le nom d'ophéline a pour composition élémentaire : C = 24,4 %; H = 6,1 %; N = 21,3 %; P = 15,7 %. Point de fusion : 272°C.

2°.- L'ophéline est une guanidine monosubstituée répondant à la formule du diester guanidoéthyl-méthyl-phosphorique :



Sa constitution a été établie par identification des produits de son hydrolyse et par comparaison du produit naturel isolé avec le même composé préparé par synthèse chimique (même point de fusion, même comportement chromatographique, mêmes produits d'hydrolyse).

3°.- Toutes les bases guanidiques présentes chez O. neglecta ont été dosées dans trois types différents de tissus.

4°.- Le phosphagène d'O. neglecta, l'acide N'-phosphoryl-guanido-éthyl-méthyl-phosphorique, est lui aussi un corps inconnu jusqu'à présent. Le produit naturel a été isolé, ses produits d'hydrolyse identifiés et dosés. La structure en a été confirmée par synthèse et par comparaison des deux corps du point de vue des propriétés chimiques et de leurs comportements enzymatiques. La présence d'un tautomère instable a été discutée.

5°.- Nous avons trouvé dans le muscle d'O. neglecta une activité enzymatique spécifique catalysant le transfert d'un radical phosphoryl de l'ATP à l'ophéline ou de la phosphophéline à l'ADP selon la réaction réversible :

$$\text{ATP} + \text{ophéline} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{ADP} + \text{phosphophéline}$$

Nous avons extrait et purifié cet enzyme que nous avons appelé ATP : ophéline phosphotransférase. Les valeurs optima de pH et de température sont respectivement 8,5 et 30°C pour la réaction directe (1) et 6,8 et 35°C pour la réaction inverse (2). Pour la réaction directe, V_{max} = 31,6 µmoles par ml, par min. et par mg de protéine enzymatique, K_m = 3 mM dans le cas de l'ATP et 5,8 mM dans le cas de l'ophéline. Pour la réaction inverse, V_{max} = 19,6 µmoles par ml, par min. et par mg, K_m = 0,5 mM dans le cas de l'ADP et 1,1 mM dans le cas de la phosphophéline.

6°.- L'ATP : ophéline phosphotransférase est assez stable à 0°C. Elle est activée par Mg^{++}, inhibée par le p-chloromercuribenzoate, la chloroacétophénone, la N-éthylmaléimide, le monoiodoacétate et l'hydroxylamine. Elle est inactive sur la créatine, l'arginine, la glycocyamine et les phosphagènes correspondants; mais elle est active sur la lombricine, la taurocyamine et la phosphotaurocyamine.

7°.- Ni le nouveau phosphagène, ni la nouvelle base guanidique ne sont présents dans une autre espèce du même genre Ophelia examinée, l'O. bicornis Savigny. Chez celle-ci, une seule base guanidique musculaire est présente, la lombricine, qui n'a été trouvée jusqu'à présent que chez des Oligochètes, où elle entre dans la constitution du phosphagène musculaire.

8°.- La nouvelle méthode d'isolement de la lombricine constitue une amélioration appréciable sur les techniques précédemment utilisées pour l'obtention de cette base à partir des Oligochètes. La lombricine isolée à partir d'O. bicornis a été cristallisée et identifiée et les bases guanidiques présentes chez ce polychète ont été dosées dans trois types différents de tissus.

9°.- Du point de vue de la biochimie de l'évolution, il est remarquable que deux espèces d'un même genre, Ophelia, possèdent

deux guanidines musculaires différentes : ophéline pour O. neglecta et lombricine pour O. bicornis, celle-ci étant considérée jusqu'à présent comme constituant caractéristique du phosphagène des Oligochètes. Le fait mérite d'autant plus d'être souligné qu'une autre espèce de la même famille d'Ophélidés, Travisia forbesii, possède dans le muscle deux types de phosphagènes différents : phosphocréatine et phosphoarginine, dont la coexistence est considérée jusqu'ici comme caractéristique des groupes zoologiques de transition (échinodermes).

BIBLIOGRAPHIE

Baldwin E. et Needham D.M. - 1934, J. Physiol. 80, 221

Baldwin E. et Yudkin W.H. - 1950, Proc. Roy. Soc. London, B 136, 614

Beatty I.M., Ennor A.H. et Magrath D.I. - 1961, Nature, 1961, 1026

Beatty I.M. et Magrath D.I. - 1960, J. Am. Chem. Soc., 82, 4983

Briggs A.P. - 1922, J. Biol. Chem., 53, 13

Clark V.M. et Warren S.G. - 1963, Nature, 199, 657

Cramer F., Schieffele E. et Vollmar A. - 1962, Chem. Ber., 95, 1670

Dagliesh C.E. - 1952, Biochem. J., 52, 3

Dixon M. et Webb E.C. - 1961, Adv. Prot. Chem., 16, 197

Eggleton P. et Eggleton G.P. - 1927, Biochem. J., 21, 190

Eggleton P. et Eggleton G.P. - 1928, J. Physiol., 65, 15

Eggleton G.P. et Eggleton P. - 1929, J. Physiol., 68, 193

Ennor A.H., Rosenberg H., Rossiter R.J., Beatty I.M., Gaffney T. - 1960, Biochem. J., 75, 179

Ennor A.H. et Stocken L.A. - 1948, Biochem. J., 43, 190

Fiske C.H. et Subbarow Y. - 1927, Science N.S., 65, 401

Fiske C.H. et Subbarow Y. - 1929, J. Biol. Chem., 81, 629

Griffiths D.E., Morrison J.F. et Ennor A.H. - 1957, Biochem. J., 65, 153

Hanes C.S. et Isherwood F.A. - 1949, Nature, 164, 1107

Hunter A. - 1928, Creatine and creatinine, Longmans, Green and Co. Ltd. London

Kuby S.A., Noda L. et Lardy H.A. - 1954, J. Biol. Chem., 210, 65

Layne E. - 1957, Methods in Enzymology, Acad. Press, New York, 3, 447

Lehmann H. - 1936, Biochem. Z. 286, 336

Liebster J., Kopoldová K. et Dobiášová M. - 1961, Nature, 191, 1198

Lineweaver H. et Burk D. - 1934, J. Am. Chem. Soc., 56, 658

Lohmann K. - 1934, Biochem. Z., 271, 264

Lohmann K. - 1935, Biochem. Z., 282, 109

Meyerhoff O. - 1928, Arch. Sci. Biol. Napoli, 12, 536

Meyerhoff O. et Lohmann K. - 1928a, Biochem. Z., 196, 22

Meyerhof O. et Lohmann K. - 1928b, Biochem. Z., 196, 49

National Research Council, - 1928, International Critical Tables of Numerical Data, McGraw-Hill, New York 3, 28; 4, 218

Needham D.M., Needham J., Baldwin E. et Yudkin J. - 1932, Proc. Roy. Soc., B 110, 260

Neuhaus F.C. et Korkes S. - 1958, Biochem. Preparations, 6, 75

Noda L., Kuby S.A. et Lardy H.A. - 1954, J. Biol. Chem. 210, 83

Noda L., Nihei T. et Morales M.F. - 1960, J. Biol. Chem. 235, 2830

Pant R. - 1959, Biochem. J., 73, 30

Pradel L.A. - 1962, Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques, Paris

Pradel L.A., Thiem N.V., Pin P. et Thoai N.V. - 1959, Bull. Soc. Chim. Biol., 41, 519

Pradel L.A. et Thoai N.V. - 1960, Biochimie comparée des acides aminés basiques, Concarneau 1959, Ed. C.N.R.S., Paris, p. 419

Rabin B.R. et Watts D.C. - 1960, Nature, 188, 1163

Robin Y. - 1954, Thèse de Doctorat ès sciences, Paris.

Robin Y. et Roche J. - 1954, Compt. rend. Soc. Biol., 148, 1783

Robin Y. et Thoai N.V. - 1962, Biochim. Biophys. Acta, 63, 481

Roche J. et Robin Y. - 1954, Compt. rend. Soc. Biol., 148, 1541

Roche J., Robin Y., Thoai N.V. et Pradel L.A. - 1960, Compar. Biochem. Physiol., 1, 44

Roche J., Thoai N.V. et Hatt J.L. - 1954, Biochim. Biophys. Acta, 14, 71

Roche J., Thoai N.V. et Robin Y. - 1957, Biochim. Biophys. Acta, 24, 514

Rosenberg H. et Ennor A.H. - 1955, Biochim. Biophys. Acta, 17, 261

Rosenberg H. et Ennor A.H. - 1959, Biochem. J., 73, 521

Rosenberg H. et Ennor A.H. - 1960, Nature, 187, 617

Rosenberg H., Ennor A.H. et Morrison J.F. - 1956, Biochem. J. 63, 153

Rosenberg H., Rossiter R.J., Gaffney T. et Ennor A.H. - 1960, Biochim. Biophys. Acta, 37, 385

Rossiter R.J., Gaffney T.J., Rosenberg H. et Ennor A.H. - 1960, Biochem. J., 76, 603

Schütze W. - 1932, Zool. Jahrbücher, 51, 505

Thiem N.V., Thoai N.V. et Roche J. - 1962, Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 285

Thoai N.V. - 1957, Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 197

Thoai N.V., Kassab R. et Pradel L.A. - 1963, Biochim. Biophys. Acta, 73, 574

Thoai N.V. et Pradel L.A. - 1962a, Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 641

Thoai N.V. et Pradel L.A. - 1962b, Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 1089

Thoai N.V. et Robin Y. - 1954a, Biochim. Biophys. Acta, 13, 533

Thoai N.V. et Robin Y. - 1954b, Biochim. Biophys. Acta, 14, 76

Thoai N.V. et Robin Y. - 1959, Biochim. Biophys. Acta, 35, 446

Thoai N.V., Robin Y., di Jeso F., Pradel L.A. et Kassab R. - 1963, Compar. Biochem. Physiol., sous presse

Thoai N.V., Robin Y. et Pradel L.A. - 1963, Biochim. Biophys. Acta, 73, 437

Thoai N.V. et Roche J. - 1957, Biochimia, 22, 319

Thoai N.V. et Roche J. - 1964, Biol. Rev., 39, 214

Thoai N.V., Roche J. et Robin Y. - 1953, Biochim. Biophys. Acta, 11, 403

Thoai N.V., Roche J., Robin Y. et Thiem N.V. - 1953, Biochim. Biophys. Acta, 11, 593

Thoai N.V. et Thiem N.V. - 1957, Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 355

Tomášek V., Hölejšovsky V., Mikes O. et Šorm F. - 1961, cités par Liebster J., Kopoldová K. et Dobiášová M., 1961, Nature, 191, 1198

Tiselius A., Hjertén S. et Levin Ö. - 1956, Arch. Biochem. Biophys., 65, 132

Yanagisawa T. - 1959, J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, IV, 8, 473

Zeile K. et Fawaz G. - 1938, Z. Physiol. Chem., 256, 193.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	1
- Objet du travail	5
Chapitre I - LES DÉRIVÉS GUANIDIQUES DANS *O. NEGLECTA* ET *O. BICORNIS*	
- Analyse chromatographique des extraits tissulaires	7
- Isolement et purification de la lombricine	11
- Isolement et purification de l'ophéline	16
- Dosages des dérivés guanidiques dans les divers tissus d'*O. neglecta*	19
- Discussion	23
Chapitre II - OPHÉLINE ET PHOSPHO-O-PHÉLINE	
- Identification et détermination de la structure de l'ophéline	26
- Synthèse de l'ophéline	30
- Isolement et purification du phosphagène d'*O. neglecta*	34
- Synthèse de la phospho-O-phéline	37
- Discussion	39
Chapitre III - ATP : OPHÉLINE PHOSPHOTRANSFÉRASE	
- Techniques	42
- Isolement et purification de l'enzyme	45
- pH et températures optima	48
- Etude cinétique	49

	Pages
- Spécificité	52
- Inhibiteurs	55
- Discussion	57
CONCLUSIONS	60
RÉSUMÉ	64
BIBLIOGRAPHIE	68

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

" Application de la spectroscopie de résonance magnétique à l'étude des réactions enzymatiques "

Vu et approuvé :

Paris, le 17 Mai *19*65

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc Zamansky

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean Roche